Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. D. Waller

DIE AUTOIMMUNE, TIEREXPERIMENTELLE MYOKARDITIS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Bernhard Wittner
aus Hechingen

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547613_0021

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. D. Waller

DIE AUTOIMMUNE, TIEREXPERIMENTELLE MYOKARDITIS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Bernhard Wittner
aus Hechingen

1983

Dekan: Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Kochsiek
2. Berichterstatter: Professor Dr. P. A. Berg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

2.4.2	Solid-Phase-Fluorometric-Assay auf Antimyosin-Antikörper	17
2.4.3	Immundiffusionstest (Ouchterlony)	18
2.4.4	Komplementbindungsreaktion mit Herzmyosin als Antigen	21
2.4.5	Kardiozytolysetest	24
2.4.5.1	Präparation der Kardiozyten	25
2.4.5.2	Kardiozytolysetest	28
2.4.5.3	Präparation der Hepatozyten	28
2.4.5.4	Hepatozytolysetest	
2.5	Methodische Ansätze zur Erfassung zellvermittelter Immunreaktionen	30
2.5.1	Intradermalteste	30
2.5.2	Isolierung der Lymphozyten	31
2.5.3	Lymphozytotoxische Reaktionen gegen kardiale Zielzellen	32
2.5.4	Antikörpervermittelte Lymphozytotoxizität gegen kardiale Zielzellen	32
2.5.4.1	Autologer Ansatz	33
2.5.4.2	Homologer Ansatz	33
2.5.5	Antigeninduzierte Stimulation der Lymphozyten	33
2.5.6	Phytohämagglutinin-induzierte Stimulation der Lymphozyten	35
2.6	Untersuchungen auf immunsuppressive Faktoren im Serum	38
2.7	Untersuchung der Seren auf Immunkomplexe	39
2.8	Histologische Untersuchungen	40
2.8.1	Hämatoxylin-Eosin- und Van-Gieson-Färbungen	40
2.8.2	Immunhistologische Untersuchungen	41

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODEN	7
2.1	Tiere	7
2.2	Antigenpräparation	7
2.2.1	Myosinisolierung	7
2.2.2	Herstellung eines Perikardextrakts	9
2.2.3	Anreicherung von Sarkolemm	10
2.2.4	Präparation von Herzhomogenat	11
2.3	Immunisierung	12
2.3.1	Immunisierung mit Myosin aus der Herz- und der Skelettmuskulatur	12
2.3.2	Immunisierung mit Herzhomogenat	12
2.3.3	Immunisierung mit Perikardextrakt und Sarkolemmanreicherung	13
2.3.4	Kontrolltiere	13
2.3.5	Blutentnahmen	13
2.4	Methodische Ansätze zur Erfassung antikörpervermittelter Immunreaktionen	14
2.4.1	Immunfluoreszenzuntersuchungen	14
2.4.1.1	Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen an Kryostatschnitten	14
2.4.1.2	Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen an azetonfixierten Rattenkardiozyten	15
2.4.1.3	Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen an vitalen Rattenkardiozyten	15

3.3.3.5	Kontrolltiere	60
3.3.4	Komplementbindungsreaktion mit Herzmyosin als Antigen	60
3.3.5	Kardiozytolysetest	62
3.4	Zellvermittelte Immunreaktionen	66
3.4.1	Intradermalteste	66
3.4.2	Lymphozytenisolierung	66
3.4.3	Lymphozytotoxische Reaktionen gegen kardiale Zielzellen	69
3.4.4	Antikörpervermittelte lymphozytotoxische Reaktionen gegen kardiale Zielzellen	71
3.4.4.1	Autologer Ansatz	71
3.4.4.2	Homologer Ansatz	71
3.4.5	Antigeninduzierte Stimulation der Lymphozyten	71
3.4.6	Phytohämagglutinin-induzierte Stimulation der Lymphozyten	74
3.5	Untersuchung auf immunsuppressive Faktoren im Serum	74
3.6	Nachweis zirkulierender Immunkomplexe	74
3.7	Histologische Untersuchungen	78
3.7.1	Hämatoxylin-Eosin- und Van-Gieson-Färbungen	78
3.7.2	Immunhistologische Untersuchungen	82
4.	DISKUSSION	84
4.1	Antikörpervermittelte Immunreaktionen	85
4.2	Nachweis von Antikörpern gegen kardiales Myosin	92
4.3	Pathogenetische Bedeutung antimyokardialer Antikörper	96
4.4	Zelluläre Immunreaktionen	98
5.	ZUSAMMENFASSUNG	102
6.	LITERATUR	105

3.	ERGEBNISSE	42
3.1	Antigenpräparationen	42
3.1.1	Myosinisolierung	42
3.1.2	Perikardextrakt	45
3.1.3	Sarkolemmanreicherung	45
3.1.4	Herzhomogenat	45
3.2	Verlauf der Immunisierung	45
3.3	Antikörpervermittelte Immunreaktion	46
3.3.1	Nachweis zirkulierender Autoantikörper im indirekten Immunfluoreszenztest	46
3.3.1.1	Nachweis der Bindung zirkulierender Antikörper an Kryostatschnitten	46
3.3.1.2	Nachweis der Bindung zirkulierender Antikörper an azetonfixierte Rattenkardiozyten	48
3.3.1.3	Nachweis der Bindung zirkulierender Antikörper an vitale Rattenkardiozyten	52
3.3.2	Solid-Phase-Fluorometric-Assay auf Antimyosin-Antikörper	52
3.3.3	Immundiffusionstest	53
3.3.3.1	Typ 1: Mit Herzmyosin immunisierte Tiere	53
3.3.3.2	Typ 2: Mit Herzhomogenat und Sarkolemm immunisierte Tiere	57
3.3.3.3	Typ 3: Mit Perikard immunisierte Tiere	57
3.3.3.4	Typ 4: Mit Skelettmuskelmyosin immunisierte Tiere	57

1. EINLEITUNG

Die physiologische Funktion des Immunsystems besteht in einer protektiven Wirkung für den Organismus: Es hat die Aufgabe, in den Körper eingedrungene Krankheitserreger (z.B. Viren, Bakterien) und Toxine (z.B. bei Diphtherie oder Scharlach) bzw. im Organismus selbst entstehende Fremdzellen (Tumoren) zu erkennen und zu eliminieren. Normalerweise besteht gegen autologe Antigene eine Immuntoleranz, die den "Horror autotoxicus" (Paul Ehrlich), die autoimmune Reaktion, verhindert. Unter pathologischen Bedingungen kann die Immuntoleranz durchbrochen werden, so daß das Immunsystem eigenes Gewebe als fremd erkennt, ein Vorgang, der zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führt.

Für immunologische Reaktionen sind im wesentlichen zwei Effektormechanismen verantwortlich:

1. die **humoralen Effektororgane**, die Antikörper produzieren, und
2. die Träger der **zellulären Immunantwort**, die sich aus Lymphozyten des Blutes und lymphatischen Gewebes (T-Zellen) sowie den mononukleären Zellen rekrutieren.

Diese Effektororgane können aus der Sicht der klassischen Immunologie über eine oder mehrere der nachfolgend beschriebenen Wege zur Zell- und Gewebsschädigung führen:

1. Die **anaphylaktische Reaktion** beruht auf der Freisetzung vasoaktiver Substanzen, die nach der Bindung von Antigenen an korrespondierende IgE-Antikörper, die an basophile Leukozyten und Mastzellen fixiert werden, erfolgt. Ent-

sprechende klinische Krankheitsbilder sind die allergische Rhinitis, das Asthma bronchiale oder der anaphylaktische Schock.

2. Die **zytotoxischen oder zytolytischen Reaktionen** beruhen auf der Lyse von Zielzellen durch gebundene Antikörper, der zumeist eine Komplementaktivierung vorausgeht. Klinische Korrelate sind z.B. die Hämolyse bei ABO-Unverträglichkeit, das Goodpasture Syndrom oder der Morbus Werlhof.

3. Die **immunkomplexvermittelte Reaktion** beruht auf der Aktivierung von Komplement durch Immunkomplexe (Theofilopoulos, 1980). Immunkomplexe können als Depots in Blutgefäßen, z.B. bei der Immunkomplexnephritis, beim Lupus erythematodes oder im Gewebe, wie bei der allergischen Alveolitis, abgelagert werden. Werden sie nur unspezifisch an Zellen angelagert, liegt ein "Innocent-Bystander"-Typ wie bei einigen Formen der Immunhämolyse vor.

4. Die **zellvermittelte Reaktion** beruht auf der zytotoxischen Wirkung von Lymphozyten gegenüber Zielzellen. Innerhalb dieser Gruppe werden drei Formen unterschieden:

   a) Die direkte Lymphozytotoxizität (DC) wird von spezifisch sensibilisierten T-Lymphozyten getragen (Woodruff und Woodruff, 1974). Klinisches Korrelat dieser Form der Hypersensibilitätsreaktion ist z.B. die Tuberkulin-Reaktion oder die Transplantatabstoßung. Die zytotoxischen T-Effektorlymphozyten werden nur dann wirksam, wenn sie neben den fremden Oberflächenantigenen auch Histokompatibilitätsantigene erkennen.

b) Die antikörpervermittelte Zytotoxizität (ADCC) beruht auf der Aktivierung einer Lymphozytensubpopulation (sog. K-Zellen) durch Antikörper, die an die Zielzellen gebunden sind (Perlmann et al, 1975). Die Träger der Spezifität sind die Antikörper.

c) K-Lymphozyten können auch dann wirksam werden, wenn keine Identitität der HLA-Antigene vorliegt, während NK-Lymphozyten cytotoxisch wirken können, auch wenn Antikörper fehlen (Perlmann, 1971).

5. Die Reaktionen, die auf der Interferenz von Antikörpern mit biologisch aktiven Substanzen beruhen, können neben der Entzündungsreaktion eine inhibierende oder stimulierende endokrine Wirkung entfalten. Klinische Krankheitsbilder sind z.B. die Basedow-Struma, die Myasthenia gravis oder die perniziöse Anämie.

In der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen unterschiedlichster Organsysteme, so auch bei endokrinen Erkrankungen wie der Hashimotothyreoiditis, dem Morbus Addison und dem juvenilen Diabetes mellitus spielen Immunreaktionen eine entscheidende Rolle. Bei den Nierenerkrankungen gilt dies für einzelne Formen von Glomerulonephritiden, bei hämatologischen Krankheitsbildern für die Immunhämolyse und die Agranulozytose, bei Lebererkrankungen für die chronisch aktive Hepatitis und die primäre biliäre Zirrhose.

Immunreaktionen gegen kardiale Antigene sind bisher selten beschrieben worden: So wies Brokmann (1937) als erster antimyokardiale Antikörper nach. Erst Kaplan (1958)

postulierte, daß auch das Herz Zielorgan immunologischer Reaktionen sein kann. Zabriskie et al (1970) zeigten die Bedeutung antisarkolemmaler Antikörper in der Diagnostik des Rheumatischen Fiebers, Sladokova et al (1979) ihre Bedeutung für die Diagnose von Myokarditiden. Maisch et al (1980, 1981) konnten zeigen, daß das gemeinsame Auftreten antimyolemmaler und antiendothelialer Antikörper charakteristisch für die virale Perimyokarditis vom Coxsackie B-, Mumps- und Influenza-Typ ist. Beim Postperikardiotomiesyndrom treten hochtitrige antisarkolemmale Antikörper gleichzeitig mit der Perikarditis auf (Engle et al, 1974, Maisch et al, 1979). Bei den kongestiven Kardiomyopathien korreliert der klinische Schweregrad (nach der New York Heart Association) mit der Inzidenz antiinterfibrillärer und antifibrillärer Antikörper (Maisch et al, 1980).

Während die diagnostische Bedeutung antimyokardialer Antikörper kaum umstritten ist, sind zahlreiche Fragen zu ihrer pathogenetischen Rolle als humorale Effektormechanismen noch offen. Beim Rheumatischen Fieber dürften antisarkolemmale Antikörper, die mit der Streptokokkenmembran und dem Herzmuskelsarkolemm kreuzreagieren, an der Pathogenese beteiligt sein (Kaplan, 1963). Auch das Postmyokardinfarktsyndrom tritt häufiger bei Patienten auf, bei denen antimyokardiale Antikörper bereits vor dem Herzinfarkt nachweisbar waren (Maisch et al, 1979). Darüberhinaus dürften T-Lymphozyten-spezifische und NK-bzw. K-Lymphozyten-spezifische Reaktionen von nicht zu unterschätzender Relevanz für die Pathogenese perimyokarditischer Vorgänge sein.

Bei experimentellen Perimyokarditiden im Tierversuch konnte nach Immunisierung mit homologem und heterologem Myokard bei Kaninchen (Asherson und Dumonds, 1963; Bidoggia et al, 1972; Chaturvedi und Mehrotra, 1967; Halbert et al, 1968, 1971 und 1973; Kaliksthein et al, 1975; Kaplan, 1958 und 1961; Laufer et al, 1966, 1969, 1972, 1973 und 1975; Thompson et al, 1971, Tomioka, 1970), bei Meerschweinchen (Basili et al, 1972; Bidoggia et al, 1974; Davis et al, 1964; Gery und Davis, 1961; Trisotto et al, 1969) und bei Ratten (Chaturvedi und Mehrotra, 1967; Cs'uky et al, 1974; Friedmann et al. 1970 und 1971; Gery und Davis, 1961; Laufer, 1973 und 1975; Lin et al, 1972) die Produktion von antimyokardialen Antikörpern induziert werden. Immunhistologische Befunde (Cs'uky et al, 1974, Tomioka, 1970) ergaben die Bindung von Immunglobulinen an sarkolemmale und subsarkolemmale Strukturen. Zytopathologische Veränderungen von Rattenkardiozyten durch antikörperhaltige Seren, die durch Immunisierung mit heterologem Myokard erzeugt wurden, beschrieben Thompson und Halbert (1971). Auch Hautteste, die an mit Herzhomogenat immunisierten Kaninchen durchgeführt wurden, fielen positiv aus (Bidoggia et al, 1972). Zytotoxische Reaktionen gegen kardiale Zielzellen durch Lymphoyten aus Lymphknoten konnten Friedmann et al (1971) und Laufer et al (1975) bei 78 % der Fälle nachweisen. Während einige Untersucher (Chaturvedi und Mehrotra, 1967) ausgeprägtere Zellinfiltrationen nur dann fanden, wenn die Titer antimyokardialer Antikörper gleichfalls erhöht waren, konnten Laufer (1975) und Tomioka (1970) keine Beziehung zwischen dem histologischen Befund und dem Titer antimyokardialer Antikörper zeigen. Die Rolle des humoralen Effektorsystems für die Entstehung myokarditischer Veränderungen bleibt deshalb umstritten. Das zelluläre

Effektorsystem wurde bislang bei tierexperimentellen, durch Immunisierung mit kardialen Antigenen induzierten Perimyokarditiden, kaum untersucht. Dagegen liegen bei Coxsackie B-3-induzierten Perimyokarditiden im murinen System von Huber et al (1980) Ergebnisse vor, die zeigen, daß zytolytische T-Zellen infizierte Myofibrillen lysieren können. Es war deshalb Ziel der vorliegenden Arbeit, in einem tierexperimentellen System an Kaninchen durch Immunisierung mit kardialen Antigenen eine autoimmune Perimyokarditis zu erzeugen. Dabei sollten humorale und zelluläre Effektormechanismen in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen kardialen Antigenen untersucht werden, um so Rückschlüsse auf die Wirkung der Effektororgane auch bei der Perimyokarditis des Menschen zu ermöglichen.

2. METHODEN

2.1 Tiere

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Kaninchen von 3 bis 4,5 kg Körpergewicht verwendet. Sie wurden in Einzelkäfigen gehalten und während des ganzen Versuchs in Bezug auf Nahrung und Pflege gleich behandelt.

2.2 Antigenpräparation

2.2.1 Myosin-Isolierung

Zur Isolierung von Herzmyosin wurde frisches Rinderherz verwendet, das nach der Entnahme in eiskalter Saline abgekühlt und sofort verarbeitet wurde. Skelettmyosin wurde aus der Skelettmuskulatur frisch geschlachteter Kaninchen isoliert.
Die Reindarstellung des Myosins erfolgte nach Katz et al (1966). Das Prinzip der Isolierung besteht in der wiederholten Umfällung und zusätzlichen Fraktionierung bei niedrigen Salzkonzentrationen. Die Isolierung erfolgte in einer Kühlzelle bei $0^{o}C$ bis $4^{o}C$. Lösungen und Reagenzien wurden vor Gebrauch auf $4^{o}C$ abgekühlt. Muskelgewebe wurde mit einem Waring Blendor zerkleinert, der Gewebebrei in Portionen zu 10 g aufgeteilt und das Myosin mit 33 ml Extraktionslösung (Guba-Straub-Lösung: 0,3 m KCl, 0,15 m Kaliumphosphat pH 6,5, 5 mM/l NaATP (Boehringer-Mannheim)) pro 10 g Gewebe extrahiert. Der Zusatz von NaATP sollte eine Dissoziation des

Aktomyosins in Myosin und Aktin bewirken. Bei saurem pH geht Aktin kaum in Lösung (Portzehl, 1950). Bei einer 0,3-molaren KCl-Konzentration ist reines Myosin, nicht aber Aktomyosin und Denaturierungsprodukte des Myosins löslich. Die Extraktionszeit von 15 Minuten wurde genau eingehalten, damit genügend Myosin gelöst wurde und sich die Verunreinigung mit Aktomyosin gering hielt. Anschließend wurden 130 ml eiskaltes Aqua dest. pro Portion unter ständigem Rühren zugegeben, Gewebereste wurden über Gaze (vierschichtig) abfiltriert. Nach Zugabe von weiteren 240 ml Aqua dest. pro Portion wurde das Myosin durch die Herabsetzung der Ionenstärke ausgefällt, während die meisten verunreinigenden, löslichen Proteine in Lösung blieben. Das ausgefällte Myosin wurde durch Zentrifugation für 20 bis 30 Minuten bei 1000 x g gesammelt (RC-3-Zentrifuge, Sorvall), der Niederschlag in 0,5 m Trisacetat-Lösung, pH 6,8, suspendiert und die Suspension durch vorsichtiges Pottern in einem Glas-Teflon-Homogenisator (Potter-Elvehyem, Braun-Melsungen) homogenisiert. Durch die Zugabe von 3 m KCl bis zur Endkonzentration von 0,3 m wurde das Myosin erneut gelöst. Denaturierungsprodukte von Myosin und Aktomyosin konnten in 20 Minuten bei 10.000 x g abzentrifugiert werden (RC-5-Superspeedzentrifuge, Sorvall). Aus dem Überstand wurde Myosin durch Zugabe von 9 Volumina eiskaltem Wasser ausgefällt, präzipitiertes Myosin anschließend durch Zentrifugation bei 1000 x g gesammelt, das Myosin im Niederschlag in 0,5 m Trisacetat, pH 6,8, suspendiert und durch erneute Zugabe von 1/10 Volumen 3 m KCl gelöst. Das verbliebene Aktomyosin wurde bei 40.000 x g für 15 Minuten abzentrifugiert und das Myosin aus dem Überstand durch Zugabe von 9 Volumina Aqua dest. ausgefällt, bei 1000 x g gesammelt und der Niederschlag durch Zugabe von 3 m KCl bis zur Endkonzentration von 0,6 m KCl gelöst. Durch Zugabe von

MgATP (Sigma) bis zur Endkonzentration von 10 mM wurde noch vorhandenes Aktomyosin dissoziiert (Weber, 1956). Das Aktin, das unter den vorhandenen Bedingungen unlöslich ist, wurde durch Zentrifugation bei 40.000 x g (2,5 Stunden) abgetrennt. In den oberen 2/3 des Überstandes befand sich reines Myosin, das noch zweimal gegen 50 Volumina einer Lösung von 0,6 m KCl und 20 mM Trisacetat, pH 6,8, dialysiert wurde (Dialysedauer: zuerst 4 bis 6 Stunden; danach 8 bis 9 Stunden). Das Myosin wurde mit gleichen Teilen Glyzerin versetzt und bei -20°C aufbewahrt. Vor jeder Verwendung wurde das Myosin frisch aus dem Glyzerin durch Dialyse gegen das 10- bis 15-fache Volumen des Myosin-Glyzerin-Gemisches eiskalten Aqua dest.'s 2,5 Stunden lang gereinigt, bis das Myosin im Dialyseschlauch ausgefallen war. Anschließend wurde es durch 30minütige Zentriguation bei 1000 x g gesammelt. Der Niederschlag wurde in wenig 50 mM Trisacetat, pH 6,8, suspendiert und durch Zugabe von 3 m KCl bis zur Endkonzentration von 0,3 m gelöst. Nach Zentrifugation bei 40.000 x g für 1 Stunde zur Entfernung von Denaturierungsprodukten wurde das Myosin erneut durch Dialyse gegen 10 Volumina eiskalten Aqua dest.'s ausgefällt, durch Zentrifugation bei 1000 x g gesammelt und der Niederschlag in 0,6 m KCl gelöst. Anschließend wurde der Proteingehalt nach Bradford (1976) bestimmt. Aus Glyzerin gereinigtes Myosin wurde entweder am gleichen Tag verwendet oder verworfen.

2.2.2 Herstellung eines Perikardextrakts

Die Präparation des löslichen Perikardextraktes erfolgte nach der von Intorp (1977, S. 37/38) beschriebenen Methode. Frisches Rinderperikard wurde sofort nach Entnahme in Saline (0°C -

$4^{o}C$) gewaschen und von Fett- und Bindegewebe befreit. Nach der Ermittlung des Feuchtgewichtes wurde das Gewebe mit der Schere in kleine Stücke geschnitten und anschließend im Virtis-Messerhomogenisator unter Zugabe von 20 ml Saline pro 10 g Perikard zerkleinert (5 x maximale Umdrehungszahl für 30 bis 40 Sekunden mit jeweils einer Pause von 1 Minute, um eine zu starke Erwärmung des Gewebebreis zu vermeiden). Danach wurde das Gewebe mit einem Sonifier B-12-Ultraschallgerät beschallt (15 x Stärke 7 für 30 Sekunden mit je 1 Minute Pause, um eine Erwärmung des Gewebes zu verhindern) und der lösliche Extrakt durch Ultrazentrifugation für 30 Minuten bei 80.000 x g (Kontron TGA-50 Ultrazentrifuge) gewonnen. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Gewebeextrakt in Diaflo-Ultrafiltrationszellen (Amicon) konzentriert, bis eine Proteinkonzentration von 7 mg/ml erreicht war. Der konzentrierte Extrakt wurde mit Millipore-Filter (0,22 um) steril filtriert. Auch bei dieser Präparation erfolgten von der Entnahme des Gewebes bis zur Verwendung des Extraktes alle Schritte in einer Kühlzelle ($4^{o}C$). Ein einmal präparierter Extrakt wurde innerhalb von 2 Tagen verwendet oder verworfen.

2.2.3 Anreicherung von Sarkolemm

Die Sarkolemmanreicherung erfolgte nach der von Kaplan und Meyeserian (1962) beschriebenen Methode. Rindermyokard wurde sofort nach der Entnahme in Saline gegeben und auf $0^{o}C$ - $4^{o}C$ abgekühlt, gründlich von Binde-, Fett-, endokardialem und epikardialem Gewebe befreit, in phosphatgepufferter Saline (PBS, pH 7,2) mit einer Schere zerkleinert und in eiskalter PBS

zur Entfernung von Blut gewaschen. Die Waschlösung wurde durch Zentrifugation (1300 x g, 20 Minuten) entfernt. Die Zerkleinerung des abzentrifugierten Gewebes erfolgte mit einem Virtis-Messerhomogenisator unter Zugabe von 15 ml PBS pro 40 g Herzgewebe. Die Gewebesuspension wurde anschließend 10 Minuten bei 200 U/min mit einem Potter-Elvehyem (Braun-Melsungen) homogenisiert und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (1300 x g, 30 Minuten, Sorvall RC-5-Zentrifuge) abgetrennt. Zur Entfernung von Substanzen, die mit Kaninchenalbumin unspezifisch präzipitieren (Kaplan, 1962), wurde der Extrakt 1:4 mit 10%iger Kaninchenalbuminlösung (Pentex-Rabbit Fraktion V, Miles) vermischt und für 2 Stunden bei 37°C und für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Entfernung der unspezifischen Präzipitate durch Zentrifugation (13.000 x g, 30 Minten), wurde die Präparation durch Sterilfilration mit Millipore-Filter (0,22 um) sterilisiert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976). Dabei wurde der gemessene Wert um 15 mg/ml verringert, da von einem Restgehalt des zugefügten Kaninchenalbumins von 15 % ausgegangen werden mußte. Sämtliche Präparationsschritte erfolgten bei 0°C -4°C. Nach Kaplan und Meyeserian (1962) ist diese Präparation 7 Tage im Kühlschrank haltbar. Bei diesen Untersuchungen wurde sie innerhalb von 2 Tagen nach der Herstellung verwendet oder verworfen.

2.2.4 Präparation von Herzhomogenat

Das Herzhomogenat wurde nach der von Halbert et al (1968) beschrieben Methode präpariert. Es wurde frisches, nach der Entnahme auf 0°C - 4°C abgekühltes Rindermyokard verwendet.

Das Herzgewebe wurde von Binde- und Fettgewebe sowie Endo- und Epikard befreit. Nach Festlegung des Naßgewichtes wurde Saline zugegeben, so daß eine Konzentration von 600 mg Herzmuskelgewebe (Naßgewicht) pro ml Saline entstand. Anschließend wurde die Gewebesuspension mit einem Virtis-Messerhomogenisator zerkleinert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

2.3 Immunisierung

2.3.1 Immunisierung mit Myosin aus der Herz- und der Skelettmuskulatur

4 Kaninchen wurden mit Herzmyosin, 3 mit Skelettmyosin immunisiert. Nach einer Grundimmunisierung, bestehend aus 1 ml Myosinsuspension in 0,9%iger NaCl (3 mg/ml) und 1 ml kompletten Freundschen Adjuvans (Gibco) intradermal in die Nackenfalte der Kaninchen, folgten in 21tägigen Abständen 7 Boosterungen. 14 Tage nach der letzten Boosterinjektion wurden die Kaninchen durch Genickschlag getötet.

2.3.2 Immunisierung mit Herzhomogenat

4 Kaninchen wurden mit Herzhomogenat immunisiert. Der Immunisierungsverlauf erfolgte analog dem unter 2.3.1 beschriebenen Schema. Eine Injektion bestand aus 1 ml Antigenlösung (7 mg/ml) und 1 ml komplettem Freundschen Adjuvans.

2.3.3 Immunisierung mit Perikardextrakt und Sarkolemmanreicherung

2 Kaninchen wurden mit Perikardextrakt, 3 mit Sarkolemmpräparation immunisiert. Auf eine Grundimmunisierung folgten 2 Boosterungen im Abstand von 21 Tagen. Grundimmunisierung und die Boosterungen bestanden aus 3 Injektionen (1 ml Antigenlösung (7 mg/ml) und 1 ml komplettes Freundsches Adjuvans). 14 Tage nach der letzten Boosterung wurden die Kaninchen getötet.

2.3.4 Kontrolltiere

Zur Kontrolle der alleinigen Wirkung des Freundschen Adjuvans erhielten 2 Kaninchen Injektionen entsprechend dem Schema 2.3.1 und 2 Kaninchen entsprechend dem Schema 2.3.3. Die Injektionen bestanden aus dem Gemisch aus 1 ml Saline und 1 ml komplettem Freundschen Adjuvans.

2.3.5 Blutentnahmen

Vor jeder Immunisierung wurden 10 ml Blut aus der Ohrarterie zur Serumgewinnung abgenommen, darüberhinaus vor der Grundimmunisierung 30 - 50 ml mit 0,5 ml Heparin (Organon Teknika) zur Lymphozytenpräparation. Das Serum wurde bei -20°C aufbewahrt. 14 Tage nach der letzten Boosterung wurden die Tiere entblutet. Zur Lymphozytenpräparation wurden 40 ml Blut mit 0,5 ml Heparin versetzt, aus dem Rest wurde Serum gewonnen. Anschließend wurden die Tiere durch Genickschlag getötet, eine Thorakotomie angeschlossen und die Organe für histologische und immunhistologische Untersuchungen entnommen (vgl. 2.8).

2.4 Methodische Ansätze zur Erfassung antikörpervermittelter Immunreaktionen

2.4.1 Immunfluoreszenzuntersuchungen

2.4.1.1 Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen an Kryostatschnitten

Der indirekte Immunfluoreszenztest wurde in Anlehnung an die von Coons et al (1950) beschriebene Methode durchgeführt. Zur Herstellung homologer Präparate wurden Kaninchen Herz-, Skelettmuskel- und Nierengewebe entnommen, in Isopentan bei -150°C fixiert und bei -70°C aufbewahrt. Zur Herstellung heterologer Präparate wurde Rindern und Ratten Herz-, Skelettmuskel-, Nieren-, Schilddrüsen- und Magengewebe entnommen und fixiert. Das Gewebe wurde mit einem Kryostaten (Bright) in 4 um dicken Schnitten auf Objektträger aufgebracht, 20 Minuten mit 1:10 verdünntem Serum inkubiert, 15 Minuten mit Coons-Puffer (Na-Barbiturat 20,6, NaCl 85,0 g, 1n HCl 80,6 ml auf 5 l Aqua dest.) gewaschen, mit fluoreszeinmarkiertem Kaninchenimmunglobulin-Antiserum (Ziege, Hyland) 20 Minuten inkubiert, wiederum mit Coons-Puffer gewaschen und unter einem Orthoplan Mikroskop (Leitz) mit der Filterkombination L2 ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität wurde mit negativ (0), schwach positiv ((+)), positiv (+), stark positiv (++) oder sehr stark positiv (+++) bewertet. Titerbestimmungen erfolgten durch Verdünnung des Serums. Die Benennung der Antikörper orientierte sich an den entsprechenden kardialen oder ubiquitären Antigenen (Abbildung 1).

KARDIALE

Antigene	Antikörper
muskelassoziierte AK	
Sarkolemm	antisarkolemmal (ASA)
Myolemm	-antimyolemmal (AMLA)
Fibrillen	antifibrillär (AFA)
- Aktin	-antiaktin (AACA)
- Myosin	-antimyosin (AMyA)
Z-Streifen	anti Z Streifen (AZA)
Mitochondrien und sarkoplasmatisches Retikulum	antiinterfibrillär (IFA)
	-homogen (Typ 1)
	-subsarkolemmal (Typ 2)
Glanzstreifen	gegen Glanzstreifen (AIDA)
organunspezifische AK	
Kerne	antinukleär (ANA)
Kapillare	antiendothelial (AEA)
Mitochondrien	antimitochondrial (AMA)

Abbildung 1:

Muskelspezifische und organunspezifische Antikörper und die entsprechenden kardialen und ubiquitären Antigene

2.4.1.2 Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung mit azetonfixierten Rattenkardiozyten

Um antisarkolemmale Antikörper von muskelspezifischen antimyolemmalen Antikörpern zu differenzieren, wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest an isolierten azetonfixierten Kardiozyten durchgeführt. Durch die Kollagenasebehandlung während der Präparation (vgl. 2.4.5) waren sie von der Basalmembran befreit worden. Die Durchführung des indirekten Immunfluoreszenztests erfolgte wie unter 2.4.1.1 beschrieben.

2.4.1.3 Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung mit vitalen Rattenkardiozyten

Bei einigen Seren wurde der indirekte Immunfluoreszenztest auch an vitalen adulten Rattenkardiozyten durchgeführt. Hierzu wurden 0,5 ml Kardiozytensuspension (Präparation 2.4.5.1) in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, mit Testserum im Verhältnis 1:10 20 Minuten inkubiert, danach 1 Minute bei 20 x g zentrifugiert und in Lösung I (vgl. 2.4.5.1) suspendiert. Nach Zentrifugation (20 x g) wurden die Zellen in der Verdünnung (1:10) mit FITC-markierten Anti-Kaninchenimmunglobulin-Antiserum 20 Minuten inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (20 x g, 1 Minute) wurden die Kardiozyten in 0,3 ml Lösung II suspendiert, auf einen Objektträger aufgetragen und als Nativpräparat unter dem Leitz Orthoplan-Mikroskop (Filterblock L2) beurteilt.

2.4.2 Solid-Phase-Fluorometric-Assay (SPFA) auf Antimyosin-Antikörper

Zur Untersuchung auf myosinbindende Antikörper wurde ein neuer fluorometrischer Test für feste Phasen (SPFA) entwickelt. Die hydrophobe proteinadsorbierende Zelluloseazetatnitrat-Oberfläche von Trägern sog. StiQs (IDT) wurde mit Antigen beschichtet. Anschließend wurden die StiQs in verdünntem Testserum inkubiert und der gebundene myosinspezifische Antikörper mit FITC-Antiimmunglobulin-Antikörpern markiert. Die quantitative Messung der FITC-markierten Antikörpern erfolgte im Fluorometer (IDT). Zur Beschichtung wurden die StiQs in 500 ul einer 200 ug/ml Myosinlösung in 0,6 m KCl (mit 50 mM Tris auf pH 7,5 gepuffert) für 12 Stunden bei $4^{o}C$ inkubiert. Dabei gewährleistete ein Horizontalschüttelgerät (FIAX-130, IDT) eine kontinuierliche Durchmischung der Inkubationslösung. Nicht gebundenes Myosin wurde durch Inkubation der StiQs in 1 ml phosphatgepufferter Saline, pH 7,5 (PBS), 20 Minuten bei $4^{o}C$ auf dem Schüttelgerät abgewaschen. Zur Aufsättigung von eventuell noch vorhandenen freien Proteinbindungsstellen auf der Zelluloseoberfläche wurde der Waschlösung 0,125 % Rinderalbumin (Sigma) zugegeben. Die StiQs wurden 60 Minuten in 500 ul 1:250 verdünntem Testserum inkubiert und danach mit 1 ml PBS + 0,125 % Rinderalbumin gewaschen. Die gebundenen Antimyosin-Antikörper wurden in 500 ul 1:50 verdünntem FITC-Antikaninchenimmunglobulin-Antiserum vom Schaf (Wellcome) für 20 Minuten bei $21^{o}C$ markiert, nicht gebundenes FITC-Antiserum durch 20minütiges Waschen in 1 ml PBS pH 7,7 + 2 % Rinderalbumin entfernt. Anschließend erfolgte die Messung im FIAX-100 Fluorometer (IDT), das die Meßergebnisse als Fluorescence-Signal-Units (FSU) angibt. Der

Meßbereich des Fluorometers reicht von 0 bis 200 FSU. Um einen Vergleich der FSU-Ergebnisse mit anderen Meßmethoden zu ermöglichen, wurden die Resultate mit Titern im indirekten Immunfluoreszenztest verglichen. Der höchst gemessene Titer im indirekten Immunfluoreszenztest war 1:640, der 184 FSU im SPFA entsprach. Einem IFL-Titer von 1:80 entsprach ein SPFA-Ergebnis von 102 FSU. Damit war es möglich, FSU in IFL-Titern auszudrücken (Abbildung 2).

2.4.3 Immundiffusionstest (Ouchterlony)

Zum Nachweis präzipitierender Antikörper wurde der zweidimensionale Immundiffusionstest nach Ouchterlony (1958) durchgeführt. Sein Prinzip beruht darauf, Antigene und Antiseren in einem Gel aufeinander zudiffundieren zu lassen. Liegt ein bestimmtes Verhältnis von Antigen zu präzipitierenden Antikörpern vor, bilden sich unlösliche Komplexe, die als Bande im Gel sichtbar werden. Als Diffusionsagar wurde 1-%iger Special Agar-Nobel (DIFCO) in 0,9 % NaCl bzw. 0,6 m KCl verwendet. Die Haltbarkeit des Agars wurde durch Zugabe von 0,2 ‰ Natrium-Azid (Merck) verbessert. 4 ml Agar wurden in Ouchterlonydiffusionsplatten (Desoga) gegossen und im Kühlschrank aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurden Löcher in den Agar gestanzt, deren Fassungsvermögen genau 100 ul betrug. Als Antigenlösungen wurden verwendet:

Herzmyosin 6 mg/ml
Skelettmyosin 6 mg/ml
Herzhomogenat 7 mg/ml
Sarkolemmpräparation 7 mg/ml
Perikardextrakt 7 mg/ml

Das Auftragen der Antigenlösungen erfolgte nach dem Schema in Abbildung 3. Die Seren der Tiere wurden vor und nach der Immunisierung in einer 0,9 % NaCl-und in einer 0,6 m KCl-Agar-Platte untersucht (Abbildung 3).

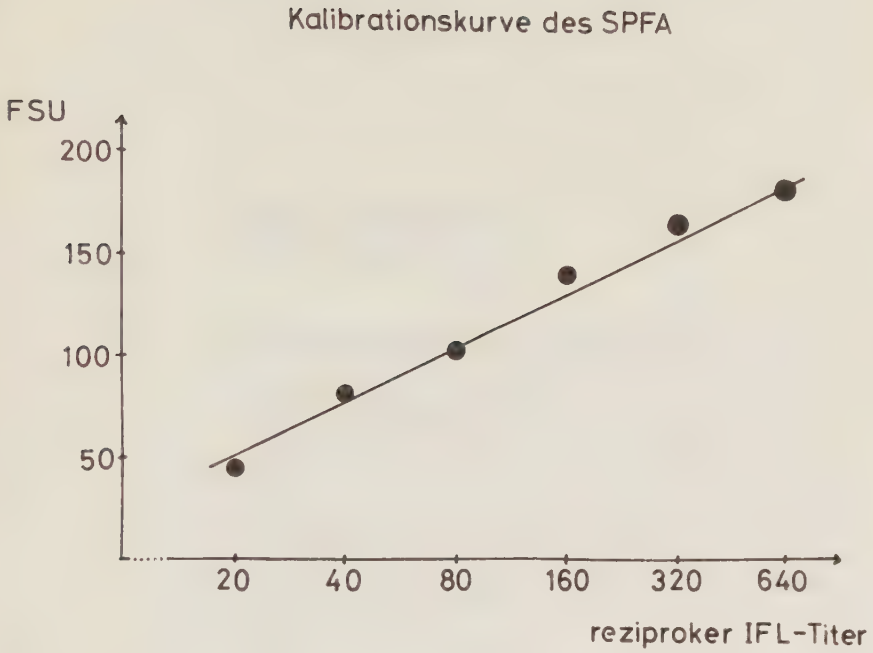
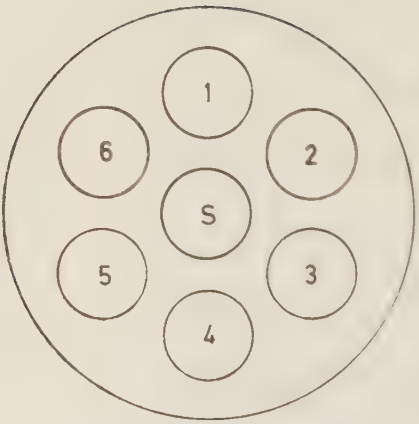


Abbildung 2:

Kalibrationskurve für die Ergebnisse des SPFA

y-Achse: FSU des SPFA in linearer Anordnung

x-Achse: Titer des indirekten Immunfluoreszenztests in logarithmischer Anordnung



	NaCl-Agar
1	Herzhomogenat (7mg/ml)
2	Sarkolemmpräp. (7mg/ml)
3	Saline
4	Herzhomogenat (3,5 mg/ml)
5	Sarkolemmpräp. (3,5 mg/ml)
6	Perikardextrakt (7mg/ml)

	KCl-Agar
1	Herzmyosin (6mg/ml)
2	Skelettmyosin (6 mg/ml)
3	Perikardextrakt (7mg/ml)
4	0,6 m KCl
5	Sarkolemmpräp. (7mg/ml)
6	Herzhomogenat (7mg/ml)

Abbildung 3:

Anordnung der Antigene im Immundiffusionstest

S: Testserum; 1 - 6 Antigenlösungen

Die Platten wurden mit Serum und Antigen beladen, zunächst 48 Stunden bei 37°C in einer feuchte Kammer und anschließend 3 Tage im Kühlschrank inkubiert. Um zu prüfen, ob bei der Inkubation bei 37°C Myosin denaturiert und deshalb keine Bande im Gel präzipitiert, obwohl präzipitierende Antikörper gegen nicht denaturiertes Myosin im Serum vorhanden sind, wurden einige Seren zusätzlich nur bei 4°C inkubiert. Unterschiedliche Muster der Präzipitationslinien im Vergleich zur Inkubation bei 37°C fanden sich aber nicht.

2.4.4 Komplementbindungsreaktion mit Herzmyosin als Antigen

Zum Nachweis von komplementbindenden Antimyosin-Antikörpern wurde die Komplementbindungsreaktion (KBR) nach Roitt und Doniach (1969) durchgeführt. Ihr Prinzip beruht auf der Bindung von Komplement an Komplexe von Antigen und Antikörpern, wobei als Indikatorreaktion eine Lyse von Hammelerythrozyten, die mit Antikörpern sensibilisiert wurden, unterbunden wird.

a) Präparation der Erythrozyten

Es wurde konserviertes Hammelblut (Behring) verwendet. Die Erythrozyten wurden zweimal in Saline gewaschen, d.h. in 10 Volumina Saline suspendiert und bei 750 x g 10 Minuten zentrifugiert. Eine genau 6 %ige Erythrozytenlösung wurde in KBR-Puffer hergestellt (Complement Fixationstest Diluent Tablets, Oxid Ltd). Dies wurde dadurch erreicht, , daß von einer etwa 6%igen Lösung 1 ml in 0,4%igem Ammoniumchlorid hämolysiert und zur Berechnung einer erforderlichen Verdünnung der Hb-Gehalt bei 541 nm in einem Photometer gemessen wurde. Zu der 6%igen Erythrozytensuspension wurde 1:1000 Antisheep-Haemolysine (Behring) zugegeben,

und danach nochmals 1:2 mit KBR-Puffer verdünnt. Die jetzt genau 3%ige Erythrozytensuspension wurde zur Bindung des Ambozeptors 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die nicht sofort benützten Erythrozyten wurden im Kühlschrank aufbewahrt, damit die Suspension mehrere Tage verwendbar blieb.

b) Verdünnung des Komplements

Die Menge des in jedem Ansatz vorhandenen Komplements (Meerschweinchen, Wellcome) sollte gerade so groß sein, daß das ganze im Ansatz vorhandene Komplement zur Lyse aller vorhandenen Erythrozyten gerade ausreicht, d.h. wenn kein Komplement fixiert wird, sollten alle Erythrozyten lysiert werden. Auf der anderen Seite sollte Komplement aber nicht im Überschuß vorhanden sein, damit auch geringe Mengen an fixiertem Komplement angezeigt werden. Um diese Komplementkonzentration zu erhalten, mußte bei der verwendeten Charge die Stammlösung 1:45 verdünnt werden. Die Richtigkeit der Komplementtitration wurde in jedem Ansatz überprüft, in dem die verwendete Komplementlösung ohne Serumzugabe in je 2 Löchern unverdünnt, 1:2 und 1:4 verdünnt zugegeben wurde. Dies führte nach Zugabe der Erythrozyten zur Lyse aller bzw. der Hälfte oder einer geringen Zahl von Erythrozyten im Ansatz.

c) Serumverdünnung

Die verwendeten dekomplementierten Seren wurden mit Hilfe von Mikroverdünnern Cooke (Dyna-tech) von 1:2 bis 1:256 verdünnt.

d) Antigenhaltige Lösung

Als antigenhaltige Lösung erwies sich eine 250 ug/ml Myosinlösung in 0,6 m KCl als richtig. Bei der Verwendung höherer Myosinkonzentrationen (750 - 1000 ug/ml) kam es zu unspezifischen Agglutinationen der Erythrozyten, die die Auswertung des Tests erheblich erschwerten.

e) Ansatz des Tests

Die Ansätze erfolgten in PS-Mikrotiterplatten 96 K, u-Form (Greiner). Zur Serumverdünnung wurde in jedes Loch der Platte zunächst 25 ul KBR-Puffer mit Hilfe von Dilutern (Dyna-tech) gegeben. Die Zugabe von 25 ul des Testserums erfolgte in das jeweils 1. Loch einer Spalte. Mit Mikroverdünnern (Dyna-tech) wurde reihenweise verdünnt. Von jedem Serum wurden zwei Ansätze durchgeführt. Einem Ansatz wurde im nächsten Schritt 25 ul der Myosinlösung zugegeben, während dem Parallelansatz 25 ul KBR-Puffer zugemischt wurden. Diese Differenzierung war notwendig, da einige Seren auch ohne Antigenzugabe antikomplementär waren. Anschließend wurden 25 ul der titrierten Kompementlösung pipettiert. Nach kurzem Mischen auf einem Titriplex wurden die Ansätze 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurde das vorhandene Komplement von Myosin-Antimyosin-Komplexen gebunden, falls das Testserum komplementbindene Antimyosin-Antikörper enthalten hat. Danach wurden 25 ul der 3%igen sensibilisierten Erythrozytensuspension als Indikatorsystem zugegeben und nochmals 30 Minuten bei 37°C und 4 bis 8 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Als Titer des Serums wurde die Verdünnungsstufe angegeben, bei der noch intakte Erythrozyten sedimentiert waren und einen kompakten Knopf am Boden des Lochs der Titerplatte bildeten.

Bei einem Teil der Seren kam es bei Serumkonzentrationen bis zu einer Verdünnung von 1:8 zu unspezifischen Agglutinationen der Erythrozyten, d.h. Agglutinationen, die nicht aufgrund spezifischer Antimyosinantikörper eine Lyse

der Indikatorerythrozyten verhinderten. Diese Agglutinationen ließen sich von echten Fixationen unterscheiden: Während bei echten Fixationen die Erythrozyten nach dem Sedimentieren einen dichten kleinen Knopf in der Mitte des Lochbodens bildeten, bedeckten die Erythrozyten bei unspezifischen Agglutinationen als dünne Lage den ganzen Boden des Lochs. Außerdem war die Hämolyse der Indikatorerythrozyten in keinem der Ansätze vor der letzten Verdünnung vollständig verhindert, was bei echten Fixationen spätestens 2 Verdünnungsstufen vor dem Titer der Fall war.

Die Verhinderung der Hämolyse durch die bereits beschriebene Antikomplementarität einiger Seren unterschied sich im Aussehen nicht von echten Fixationen, so daß in diesen Fällen eine echte Fixation nur dann angenommen werden konnte, wenn der Titer im Antigenansatz mindestens 2 Titerstufen größer war als im Ansatz ohne Antigenzusatz. Dies zeigte sich jedoch bei keinem der antikomplementären Seren.

2.4.5 Kardiozytolysetest

Zur Untersuchung der Kaninchenseren auf zytolytische Aktivitäten gegen Myozyten vor und nach der Immunisierung wurden vitale adulte Rattenkardiozyten mit den Testseren unter Zusatz von Komplement inkubiert. Als Kontrollzellen dienten vitale adulte Rattenhepatozyten, die mit den Testseren unter Komplementzusatz untersucht wurden.

2.4.5.1 Präparation der Kardiozyten

Die Präparation erfolgte nach der Methode von Powell und Twist (1976) in einer Modifikation von Maisch et al (1981; Abbildung 4). 200 g schwere männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden mit Äther betäubt und durch intraperitoneale Injektion von 0,2 ml Thiopental (Evipan^{R}, Bayer) pro 100 g Körpergewicht narkotisiert. Anschließend wurde den Ratten 2.500 IE Heparin in die Femoralvenen injiziert, das Herz aseptisch präpariert (Opie, 1962) und in Lösung I (120,5 mM NaCl, 13,1 mM $NaCO_3$, 2,6 mM CaCl, 1,18 mM KH_2PO_4, 1,18 mM $MgSO_4$, 11,1 mM Glukose und 0,1% Albumin) gewogen. Eine Knopfkanüle wurde in die Aorta eingeführt, diese dann ligiert, und das Herz an einem Perfusionsapparat nach Langendorff zunächst mit 20 ml/min perfundiert. Die abtropfende bluthaltige Perfusionslösung wurde verworfen, die Perfusionsgeschwindigkeitkeit danach auf 10 ml/min vermindert und 60 mg Kollagenase (Roh-Kollagenase, Typ I, Worthington 125 - 250 U/mg in 10 ml Lösung I und mit 25 umol/l $CaCl_2$) zugegeben. Nachdem die Kollagenaselösung das Herz erreicht hatte, erfolgte eine Reduktion der Perfusionsgeschwindigkeit auf 5 ml/min, was 16,5 Minuten pro Gramm Ausgangsgewicht Myokard beibehalten wurde. Das Herz wurde abgenommen, in 1 mm dicke Streifen geschnitten und in ein Teflonbecherglas mit 10 ml oxigenierter, mit 20 mg Kollagenase versetzter Lösung II gegeben. Ihre Zusammensetzung entsprach derjenigen von Lösung I, abgesehen von einer auf 2 % erhöhten Albuminkonzentration. Durch Resuspendieren der Myokardpartikel mit einer sterilen Pipette, wurde das Herauslösen der Zellen aus dem Gewebsverband beschleunigt. Nach 15 Minuten waren die Myokardpartikel fast völlig dissoziiert. Die Suspension wurde

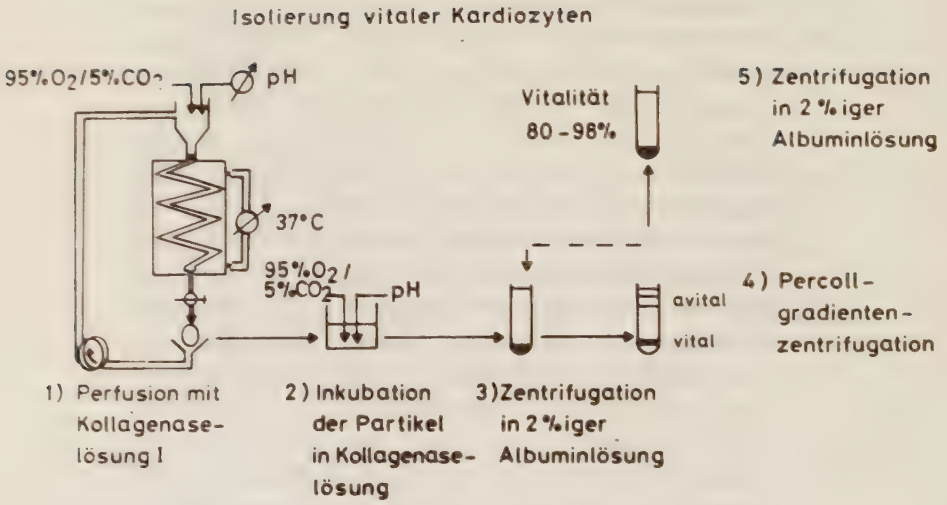


Abbildung 4:

Isolierung und Anreicherung vitaler Kardiozyten (vgl. Maisch et al 1981)

durch Nylongaze (200 um Maschengröße) filtriert, in Teflonröhrchen 1 Minute (20 x g) zentrifugiert und zweimal in Lösung I gewaschen. Die vitalen Kardiozyten wurden durch Zentrifugation über einen kontinuierlichen Percoll-Gradienten angereichert (Maisch et al, 1981). 2,5 ml der Kardiozytensuspension wurden auf den Gradienten aufgetragen, der aus 4 Teilen Percoll TM (Pharmacia) und 6 Teilen Lösung I bestand; um einen S-förmigen kontinuierlichen Gradienten zu erhalten, wurde das Gemisch vor der Kardiozytenisolierung für 60 Minuten bei 20.000 x g (Sorvall R2) zentrifugiert. Ein äquivalentes Volumen an Puffer, der "Density Marker Beads" enthielt, wurde auf einen zweiten Gradienten geschichtet. Die Trennung der Kardiozyten erfolgte durch Zentrifugation bei 400 x g für 3 - 5 Minuten (20°C). Die vitalen Kardiozyten reicherten sich in einer Bande zwischen den Dichten 1,065 und 1,069 g/ml an, während die avitalen Zellen zwischen 1,010 und 1,035 g/ml erschienen. Die vitalen Zellen wurden in Lösung II resuspendiert und durch 3minütiges Zentrifugieren bei 50 x g (20°C) gewaschen, danach der Prozentsatz der vitalen Zellen bestimmt. Als Vitalitätskriteren galten: deutliche Querstreifung, glatte Begrenzung der Zellmembran ohne Abrundung der Zellen, Ausschluß von Trypanblau (0,3 %) und die Aufnahme von Fluoreszeindiazetat (0,05 %) sowie gelegentliche spontane Kontraktionen der Zellen. Die präparierten Kardiozyten wurden sofort weiter verwendet oder im Brutschrank bei 37°C in oxigenierter Lösung II aufbewahrt.

2.4.5.2 Kardiozytolysetest

Die zytolytische Serumaktivität gegen vitale Kardiozyten wurde vor und nach der Immunisierung in zweifachen Ansätzen in Mikrotiterplatten (Falcon multiwell 3008) durchgeführt. 250 ul Kardiozytensuspension (1×10^5 Zellen/ml) wurden in 100 ul komplementhaltigen Humanserums einer gesunden Person (Komplementquelle) und 50 ul dekomplentierten Testserums inkubiert. Vor der Zugabe des Komplements sowie 3 Stunden, 9 Stunden und 16 Stunden danach wurde der Anteil vitaler Kardiozyten bestimmt und die Halbwertsüberlebenszeit (t_{50i}) der Kardiozyten in Gegenwart des Testserums mit der Halbwertsüberlebenszeit derselben Kardiozyten in Gegenwart von normalem Kaninchenserum (t_{50o}) verglichen. Dieser Quotient entspricht dem Zytolyseindex (ZI):

$$ZI = \frac{t_{50i}}{t_{50o}}$$

2.4.5.3 Präparation der Rattenhepatozyten

Das Abdomen narkotisierter Ratten wurde durch einen Rippenbogenrandschnitt und eine Lumbotomie eröffnet, ein Zwirnfaden um die Pfortader und die untere Hohlvene oberhalb der Einmündung der rechten Nierenvene gelegt und die Pfortader 5 mm längs eingeschnitten. In den Einschnitt wurde eine Teflon-Kanüle eingeführt, an die ein Schlauch mit Waschlösung (Ca^{++}-freies Minimal Essential Medium mit Earles Spinnter Buffered Salt Solution, 2 mM Glutamin und 20 mM Hepes-Puffer, pH 7,2) angeschlossen war. Die untere Hohlvene wurde

unterhalb der Ligatur durchtrennt und die Leber für 15 Minuten (10 ml/min) antegrad perfundiert. Der oberhalb des Zwerchfells gelegene Teil der unteren Hohlvene wurde präpariert und mit einem Faden umschlungen. Bei Ligatur der unteren Hohlvene kurz oberhalb der rechten Nierenvene, füllte sich der Anteil unterhalb des Zwerchfells. Dieser wurde inzidiert, eine Teflon-Kanüle eingeführt und fixiert. Die Leber wurde entnommen und retrograd auf einer perforierten Scheibe perfundiert. (Minimal Essential Medium mit Hanks Buffered Salt Solution, pH 7,2, 2 mM Glutamin und 50 mg/100 ml Kollagenase; Collagenase aus Clostridium histolyticum, 0,15 U/mg, lyophilisiert, Boehringer Mannheim). Die abtropfende Perfusionslösung wurde in einem auf 37°C erwärmten Erlenmayer-Kolben aufgefangen. Von hier wurde die Lösung (37°C) oxigeniert und zurück zur Leber geleitet. Die Reperfusion erfolgte 20 Minuten lang (Perfusionsgeschwindigkeit 40 ml/min). Die Leber wurde von Bindegewebe befreit, in 40 ml Perfusionslösung mit Kollagenase gegeben und mit einem Skalpell abgeschabt. Die Suspension wurde nach erneuter Zugabe von 50 ml Minimal Essential Medium 5 Minuten geschwenkt, sedimentiert und durch Nylongaze einer Maschenweite von 150 um filtriert. Größere Gewebestücke wurden nochmals im Erlenmayerkolben geschwenkt (5 Minuten) und anschließend filtriert. Das Filtrat enthielt vitale Hepatozyten, die mehrmals in Waschlösung (vgl. oben) gewaschen wurden (50 x g; 2 Minuten). Als Vitalitätsprüfung diente der Ausschluß von Trypanblau (0,3 %) und die Kontrolle im Phasenkontrastmikroskop: Bei vitalen Zellen leuchtete die Zellmembran auf, die Oberfläche der Zellen war glatt, das Zytoplasma homogen.

2.4.5.4 Hepatozytolysetest

Die Bestimmung der Hepatozytolyse erfolgte analog zur Kardiozytolyse: 250 ul Hepatozytensuspension, 100 ul komplementhaltiges Humanserum derselben Charge wie unter 2.4.5.2 und 50 ul Testserum wurden bei 37°C und 5 % CO_2 in einer feuchten Atmosphäre inkubiert. Vor der Zugabe des Komplements sowie 3 Stunden, 9 Stunden und 15 Stunden danach, wurde der Anteil der vitalen Hepatozyten bestimmt und für jedes Testserum die Halbwertsüberlebenszeit der zu Beginn des Versuchs vorhandenen vitalen Hepatozyten, und daraus der Zytolyseindex (ZI) wie oben beschrieben, bestimmt:

$$ZI = \frac{t_{50i}}{t_{50o}}$$

2.5 Methodische Ansätze zur Erfassung zellvermittelter Immunreaktionen

2.5.1 Intradermalteste

Der Nachweis einer zellulären Immunreaktion wurde im intradermalen Test, analog dem Mendel-Mantoux-Test durchgeführt. Bei der Boosterung wurde jedem Tier in die laterale Bauchhaut 0,1 ml einer 0,1%igen Lösung (in 0,9 % NaCl) des Antigens, mit dem es immunisiert worden war, intrakutan injiziert und die Injektionsstelle markiert. Als Kontrollinjektion dienten 0,1 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung. Auswertungen erfolgten nach 1, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden, wobei der Durchmesser des Erythems und der Grad der Infiltration nach folgendem Schema bestimmt wurde:

keine Reaktion =	Grad 0
Erythem < 3 mm und Infiltration + =	Grad 1
Erythem > 3 mm aber < 7 mm und Infiltration ++ =	Grad 2
Erythem > 7 mm und Infiltration +++ =	Grad 3

Eine zelluläre Reaktion wurde angenommen, wenn nach 1 und 6 Stunden noch keine Reaktion sichtbar gewesen war, und sie nach 24, 48 und 72 Stunden in ihrer Ausprägung zunahm oder gleichblieb. Falsch positive Reaktionen im Sinne eines Arthus-Phänomens konnten dadurch ausgeschlossen werden.

2.5.2 Isolierung der Lymphozyten

Lymphozyten wurden über einen Ficoll-Isopaque-Gradienten nach der von Bøyum (1968) angegebenen und von Goldrosen et al (1977) modifizierten Methode isoliert. Die Modifikation nach Goldrosen war notwendig, da sonst die Plättchenkontamination der Lymphozytensuspension so groß war, daß es zu Agglutinationen der Lymphozyten in der Kultur kam. Heparinisiertem Blut aus der Ohrarterie wurde ADP (Sigma) zugegeben, bis eine Konzentration von 0,01 ng/ml Blut entstand. Das Blut wurde 45 min bei 37°C inkubiert, anschließend 1:1 mit RPMI 1640 (Gibco) verdünnt, über eine 9,6% Natrium-Metriozoate und 5,6 % Ficoll-Lösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml (Lymphoprep, Nyegaard) geschichtet und bei 500 x g (45 min) zentrifugiert. Die Lymphozyten wurden aus der Interphase entnommen und dreimal in RPMI 1640 gewaschen. Die vitalen Zellen wurden durch Färbung mit Acridin-orange (Merck; 70 ug/ml; Lymphozytensuspension: Acridin-orange = 1:10) markiert. Nur Zellen mit "normaler"

Kernstruktur und intaktem Zytoplasma wurden als vital gewertet. Die Suspension wurde auf 2 x 10^6 vitale Lymphozyten/ml in RPMI 1640 mit 2 ul/ml Gentamycin (Flow) und 2mM Glutamin eingestellt.

2.5.3 Lymphozytotoxische Reaktionen (DC) gegen kardiale Zielzellen

Sensibilisierte Lymphozyten von Kaninchen, die mit kardialem Myosin und Herzhomogenat immunisiert worden waren, wurden mit vitalen adulten Rattenkardiozyten (Präparation siehe 2.4.5.1) inkubiert und die Halbwertsüberlebenszeiten der Kardiozyten in Gegenwart von Testlymphozyten (t_{50i}) mit der Halbwertsüberlebenszeit der Kardiozyten in Gegenwart von Kontrollymphoyzten (t_{50o}) verglichen. Es wurden 250 ul Kardiozytensuspension (1 x 10^5 Zellen/ml) und 125 ul Lymphozytensuspension (2 x 10^6 Zellen/ml) in Mikrotiterplatten (Falcon multiwell) gegeben und in einer feuchten Kammer bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

2.5.4 Antikörpervermittelte Lymphozytotoxizität (ADCC) gegen kardiale Zielzellen

Zur Untersuchung der ADCC erfolgte in zwei Ansätzen:

1. Die zytolytische Aktivität der Lymphozyten der Versuchstiere in Gegenwart autologen Serums (autologer Ansatz)

2. Die zytolytische Aktivität der Lymphozyten eines unbehandelten Kaninchens in Anwesenheit des Serums der immunisierten Tiere (homologer Ansatz).

2.5.4.1 Autologer Ansatz

475 ul Kardiozytensuspension (0,53 x 10^5 Zellen/ml) wurde mit 125 ul Testlymphozyten (2 x 10^6 Zellen/ml) in 60 ul autologem dekomplementiertem Serum bei 37°C, 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert (Kardiozyten/Lymphozyten = 1:10). Die vitalen Kardiozyten wurden nach 3 Stunden, 7 Stunden und 15 Stunden unter dem Phasenmikroskop ausgezählt und t_{50i} im Vergleich zu t_{50o} eines Kontrollansatzes bestimmt.

2.5.4.2 Homologer Ansatz

Beim homologen Ansatz wurde die Kardiozyten/Lymphozyten-Relation von 1:10 auf 1:50 erhöht.

200 ul Kardiozytensuspension (1 x 10^4 Zellen/ml) wurden mit 70 ul Lymphozytensuspension (1,5 x 10^6 Zellen/ml) in 50 ul Testserum bei 37°C, 5 % CO_2 in einer feuchten Kammer inkubiert und die vitalen Kardiozyten nach 7, 10, 18 und 24 Stunden unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und t_{50i} im Vergleich t_{50o} bestimmt.

2.5.5 Antigeninduzierte Stimulation der Lymphozyten

Die Lymphozyten der Versuchstiere wurden mit dem Antigen, mit dem sie immunisiert wurden, in vitro kultiviert und nach 6 Tagen der H^3-Thymidin-Einbau als Maß für die Stimulation der Lymphozyten durch das Antigen gemessen. Dieser Stimulationstest wird als Hinweis auf die zellvermittelte

Immunantwort gegenüber einem spezifischen Antigen betrachtet (Roitt, 1977; Thestrup-Petersen, 1976; McLaughlin, 1972).

In Vorversuchen zeigte sich, daß Antigenkonzentrationen größer als 50 ug/ml die Lymphozytenproliferation unspezifisch supprimieren. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Thestrup-Petersen (1976) bei Stimulationsversuchen humaner Lymphozyten mit leberspezifischem Protein. Es fanden deshalb Antigenkonzentrationen von 0, 2, 20 und 50 ug/ml Kulturlösung in eim modifizierten Mikroansatz nach Penhale et al (1974) Verwendung. Eine Kultur des Dreifachansatzes mit autologem oder homologem Serum (Poolserum mehrerer nicht behandelter Kaninchen) setzte sich wie folgt zusammen:

20 % Serum (homolog oder autolog)	= 40 ul
30 % Antigenlösung in RPMI 1640 (+2mM Glutamin + 2 ul/ml Gentamycin), so daß die Endkonzentration 0,2, 20 bzw. 50 ug Protein/ml Kultur betrug	= 60 ul
50 % Lymphozytensuspension in RPMI (+Glutamin + Gentamycin), so daß die Endkonzentration 1 x 10^6 Zellen betrug	= 100 ul

Die Ansätze wurden auf einem Titriplex gemischt (10 sec) und 6 Tage bei 37^0C, 5 % CO_2 in einer feuchte Kammer inkubiert.

Danach wurden 20 ul einer 5,5 uM H^3-Thymidin-Lösung mit einer molaren Aktivität von 2 Ci/mM (Radiochemicals Amersham, Buchler) pro Ansatz zugegeben, so daß die Radioaktivität 0,22 uCi/Kultur betrug. Die Kulturen wurden erneut mit einem Titriplex gemischt

und 6 Stunden bei 37°C, 5% CO_2 in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit einem Titertek (Skatron) auf Glasfiberfilter übertragen, wobei die Zellen mit Aqua dest. lysiert, freies H^3-Thymidin durch die Filter gewaschen, das in die DNA der Lymphozyten eingebaute H^3-Thymidin jedoch auf dem Filter festgehalten wurde. Die Aktivität der Filter, die der in der DNA eingebauten H^3-Thymidinmenge entspricht, wurde nach dem Trocknen in einem Liquid-Scintillation-Counter (Tricomb 3375) als counts per minute (cpm) gemessen und der Mittelwert der Dreifachansätze und die Standardabweichung berechnet. Das Ergebnis wurde nur dann verwertet, wenn die Standardabweichung kleiner als 25 % des Mittelwertes war. Aus dem Mittelwert wurde folgender Stimulations-Index berechnet:

$$\text{Stimulationsindex (SI)} = \frac{\text{cpm der Kultur mit Antigenzusatz}}{\text{cpm der Kultur ohne Antigenzusatz}}$$

Eine antigeninduzierte Stimulation der Testlymphozyten wurde angenommen, wenn der Stimulationsindex 2 überschritt.

2.5.6 Phytohämagglutinin-induzierte Stimulation der Lymphozyten

Phytohämagglutinin (PHA), ein Extrakt aus Keimen der Bohne "Phaseolus vulgaris", regt alle T-Lymphozyten zur Proliferation an. Das Ausmaß der Lymphozytentransformation ist ein unspezifisches Maß zellvermittelter Immunreaktivität (Penhale, 1974; Oppenheim, 1970; Roitt, 1977, S. 164). Der Versuchsansatz erfolgte nach der Mikromethode von Penhale (1974). In Vorversuchen ergaben 5 ug PHA/ml je Kultur und eine Inkubationszeit von 72 Stunden bei der Verwendung von gereinigtem PHA (Wellcome) die besten Ergebnisse (Abbildung 5). Die Ansätze für jedes Kaninchen erfolgten wiederum in Dreifachansätzen, je einmal im autologen System

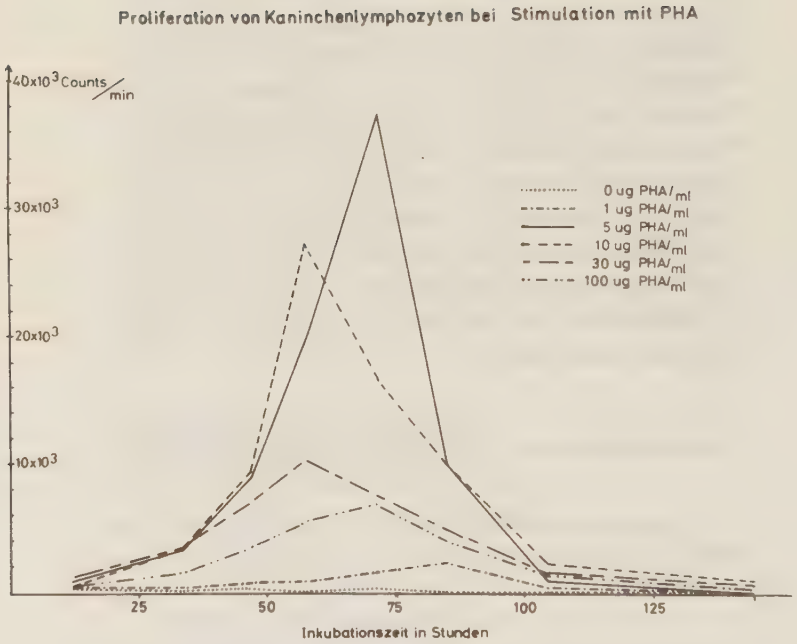


Abbildung 5:

Dosis-Wirkungs-Kurve der Proliferation normaler Kaninchenlymphozyten nach Stimulation mit Phytohämagglutinin. In Abhängigkeit von der Mitogendosis und der Inkubationszeit ergaben sich optimale Zählraten bei 5 ug PHA/ml und 72 Stunden.

und einmal im homologen System, wobei hier Poolserum mehrerer unbehandelter Kaninchen verwendet wurde. Die Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

20 % Serum (autolog bzw. homolog) = 40 ul
30 % PHA-Lösung in RPMI 1640 (+Glutamin+Gentamycin) so daß eine Endkonzentration in der Kultur von 5 ug/ml entstand = 60 ul
50 % Lymphozyten-Suspension in RPMI 1640 (+Glutamin +Gentamycin), so daß eine Endkonzentration von 1×10^6 Zellen entstand = 100 ul

Nach dem Mischen auf einem Titriplex wurden die Ansätze 72 Stunden bei 37^oC, 5 % CO_2 in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden 20 ul 5,5 uM H^3-Thymidin-Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 2 Ci/mMol (Radiochemicals Amersham, Buchler) zugegeben, so daß die Aktivität 0,22 uCi pro Kultur betrug. Nach erneutem Mischen wurde genau 6 Stunden bei 37^oC und 5 % CO_2 in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Lymphozyten aufgearbeitet und die in die DNA eingebaute Aktivität im Liquidszintillation-Counter gemessen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Dreier-Ansätze wurden berechnet. Ein Ansatz wurde nur dann ausgewertet, wenn die Standardabweichung kleiner als 20 % des Mittelwertes war. Aus den Mittelwerten wurde der Stimulationsindex (SI) berechnet:

$$SI = \frac{\text{cpm des Versuchstieres}}{\text{cpm eines unbehandelten Kontrolltieres}}$$

wobei als Kontrolltier vor und nach der Immunisierung dasselbe Kaninchen diente.

2.6 Untersuchung auf immunsuppressive Faktoren im Serum (SIF)

Die Seren der immunisierten Tiere wurden im Verlauf der Immunisierung auf Serumfaktoren untersucht, die die PHA-induzierte Stimulation normaler Lymphozyten inhibieren können.

Hierzu wurden die Lymphozyten eines unbehandelten Kaninchens mit dem Serum der immunisierten Tiere inkubiert und die Proliferationsrate der mit PHA-stimulierten Lymphozyten durch die Messung des H^3-Thymidin-Einbaus in die DNA analog zu 2.5.5 und 2.5.6 gemessen. Der Kulturansatz erfolgte dreifach in PS-Gewebekulturen (u-Form, Greiner).

200 ul Kultur bestanden aus

20 % Testserum = 40 ml

30 % PHA-Lösung in RPMI 1640, so daß eine Endkonzentration von 5 ug/ml erreicht wurde (+ 2 mM Glutamin + 2 ul/ml Gentamycin) = 60 ml

50 % Lymphozytensuspension in RPMI 1640, so daß die Endkonzentration 1×10^6 Zellen/ml entspricht (+ 2 mM Glutamin + 2 ul/ml Gentamycin) = 100 ml

Die Kulturen wurden 72 Stunden bei 37°C (5 % CO_2) in einer feuchten Atmosphäre inkubiert. Nach Zugabe von 20 ul H^3-Thymidinlösung wurde die Inkubation 6 Stunden fortgesetzt, danach die DNA der Lymphozyten auf Glasfiberfilter aufgebracht und die Radioaktivität als das Maß der Proliferation in einem Liquid-Szintillation-Zähler analog zu 2.5.5 und 2.5.6 gemessen. Werte wurden nur dann berücksichtigt, wenn die Standardabweichung der Dreifachansätze kleiner als 20 % des Mittelwertes war.

Der SIF-Index wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{SIF-Index} = \frac{\text{cpm der Lymphozyten im Testserum nach Immunisierung}}{\text{cpm der Lymphozyten im Serum des Kaninchens vor der Immunisierung}}$$

2.7 Untersuchung der Seren auf Immunkomplexe

Der Nachweis von Immunkomplexen erfolgte mit dem Solid-Phase-Fluorometric Assay (SPFA). Sein Prinzip beruht darauf, daß an eine Festphase absorbiertes C1q bei der Inkubation im Serum Immunkomplexe bindet. Der Nachweis der gebundenen Immunkomplexe erfolgt mit FITC-markierten Anti-Kaninchenimmunglobulin-Antikörpern. Da die Bindung des C1q an Immunkomplexe nicht spezifisch ist (vgl. Prinzip der KBR), kann auch humanes C1q zum Nachweis von Immunkomplexen in Kaninchenseren verwendet werden. Durch Inkubation von StiQs (IDT) in 500 ul C1q-Lösung (1000 mg/ml, Behring) in barbituratgepufferter Saline, pH 7,5, über 3 Tage bei 4°C wurde humanes C1q an die Zelluloseacetat-Nitrat-Oberfläche der StiQs absorbiert. Überschüssiges C1q wurde mit 1 ml barbituratgepufferter Saline, pH 7,5, entfernt. Eventuell noch vorhandene freie Bindungsstellen auf dem StiQ wurden mit

1%iger BSA-Waschpufferlösung abgedeckt. Anschließend wurden die StiQs 30 Minuten in 25 ul Serum, das in 500 ul Waschpuffer II (0,05 mol Tris-HCl, 0,15 m NaCl, 0,1 m EDTA und 0,25 % Twin20) verdünnt wurde, inkubiert. Nach einem Waschgang (10 Minuten in 1 ml Waschpuffer II, 4°C) wurden die gebundenen Immunkomplexe an den StiQs mit 500 ul 1:50 verdünntem FITC-markiertem Anti-Kaninchenimmunglobulin-Antiserum vom Schaf (Wellcome) markiert. Die Antiseren waren in einer wässrigen Lösung von 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,11 % Na_2HPO_4 und 0,02 % KH_2PO_4 bei pH 8.3 verdünnt worden. Überschüssiges FITC-Antiserum wurde durch 10minütiges Waschen in 1 ml Waschpuffer entfernt und die Bindung der FITC-Antikörper in einem Fluorometer (FIAX-TM 100; IDT) in FSU (fluorescence signal units) gemessen. Eine die Normalseren überschreitende Anzahl von FSU war beweisend für das Vorhandensein zirkulierender Immunkomplexe im Serum.

2.8 Histologische Untersuchungen

2.8.1 Hämatoxylin-Eosin- und Van-Gieson-Präparate

Den Tieren wurde nach der Immunisierung Gewebeproben aus der freien Wand des linken Ventrikels und dem Musculus quadriceps femoris entnommen und in Formalinlösung nach Lilly fixiert.

Die histologischen Präparate wurden freundlicherweise von Herrn Dr. med. H. Wiethölter (Neurologische Universitätsklinik Tübingen) angefertigt und ausgewertet.

2.8.2 Immunhistologische Untersuchungen

Gewebeproben aus dem linken Ventrikel, dem Musculus quadriceps femoris und der Niere wurden bei -150°C in Isopentan fixiert, 4 um dicke Kryostatschnitte angefertigt und mit FITC-markiertem Anti-Kaninchenimmunglobulin-Antiserum von der Ziege (Hyland) inkubiert, analog zu 2.4.1.1 gewaschen, in Glycerin-Glycerinphosphat-Puffer fixiert und unter einem Leitz Orthoplan Mikroskop (Filterblock L2) ausgewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Antigenpräparationen

3.1.1 Myosinisolierung

Herzmyosin wurde einmal aus 1 kg Rinderherz isoliert. Dabei konnten 550 mg Myosin, ausreichend für sämtliche Untersuchungen, isoliert werden. Skelettmuskelmyosin wurde zweimal aus je 0,5 kg Kaninchenmuskulatur gewonnen. Mit ca. 200 mg reinem Myosin pro Isolation war die Ausbeute etwas geringer. Die Reinheit der Myosinpräparationen wurde mit einer Natriumdodecylsulfatpolyacrylamid-(SDS-)Diskelektrophorese, geprüft und war, wie Abbildung 6 zeigt, gut. Außer geringen Spuren eines verunreinigenden Proteins (Bande T) fanden sich nur die typischen Banden der Teilproteine HC (heavy chain), LC_1 (=light chain) und LC_2. Bei Skelettmyosin wurde eine dritte leichte Kette dargestellt. Die Abbildung 7 zeigt eine Schematisierung des myokardialen Myosinmoleküls mit der schweren Kette (= HC in Abbildung 6) und den beiden leichten Ketten (= LC_1 + LC_2). Bei skeletogenem Myosin kommt eine dritte Bande (LC_3) hinzu.

Durch die Reinigung aus dem Glyerin wurde bis zu 10 % Myosin verloren.

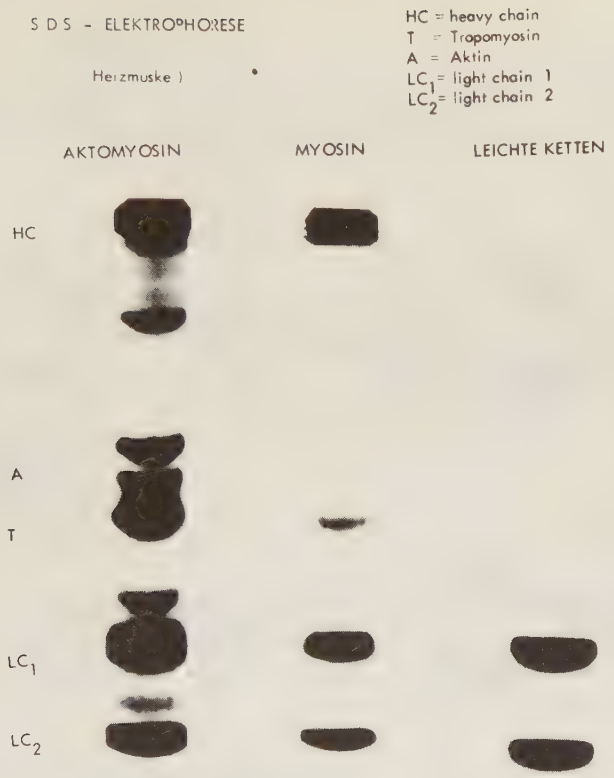


Abbildung 6:

Reinheitsbesimmung der Myosinpräparationen durch SDS-Discelektrophorese

linke Spalte: ungereinigtes Aktomyosin

mittlere Spalte: Herzmyosin mit schwerer Kette (HC), den leichten Ketten (LC_1 und LC_2) sowie eine nicht ausreichend definierten Bande (z.B. Tropomyosin oder F-Protein, 4.4)

rechte Spalte: leichte Ketten (LC_1 und LC_2)

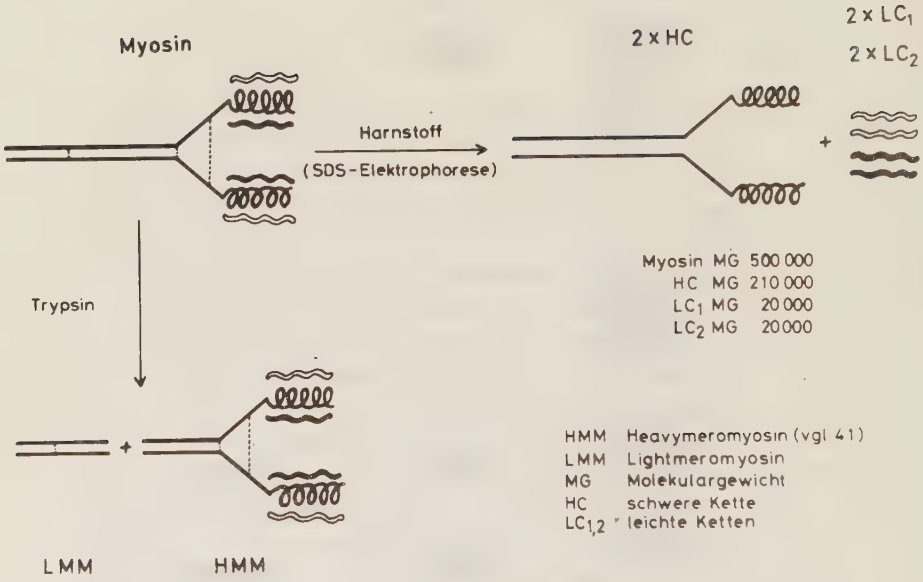


Abbildung 7:

Schematische Zeichnung des Myosinmoleküls; (Beim Skelettmuskelmyosin ist bei einem kleineren Teil der Moleküle eine leichte Kette, LC_2, durch eine dritte ersetzt, LC_3; so daß in der Elektrophorese drei leichte Ketten erscheinen).

3.1.2 Perikardextrakt

Ausgehend von 50 g Perikard ergab sich nach der Präparation und Ultrafiltration 7 ml Lösung mit 7 mg/ml Protein.

3.1.3 Sarkolemmanreicherung

Ausgehend von 50 g Myokard erhielt man 25 ml Lösung mit einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml.
Unter Berücksichtigung des 1,5% Kaninchen-Albumin Zusatzes ergibt sich eine Proteinkonzentration des Antigens von etwa 15 mg/ml.

3.1.4 Herzhomogenat

Bei der Verwendung von 10 g Myokardgewebe wurden 17 ml einer breiigen Antigenpräparation mit einer Proteinkonzentration von etwa 12 mg/ml erhalten.

3.2 Verlauf der Immunisierung

Sechs Tage nach der Grundimmunisierung verstarb ein Versuchstier, das mit Herzhomogenat immunisiert wurde. Nach der 2. Immunisierung verstarb ein Versuchstier, das mit der Sarkolemmanreicherung geboostert worden war und 4 Tage nach der 1. und 6. Boosterung verstarb je ein Kontrolltier. Da die Seren, die bei der 2. Boosterung entnommen wurden, bei den mit Perikardextrakt und Sarkolemmanreicherung immunisierten Tieren im indirekten Immunfluoreszenz- und im Immundiffusiontest hohe Antikörpertiter zeigten, wurden diese

Tiere bereits 14 Tage nach der 2. Boosterung aufgearbeitet. Außerdem wurde ein Kontrollkaninchen getötet. 14 Tage nach der 7. Boosterung wurden die übrigen Kaninchen entblutet und die Biopsien entnommen. Da bei einem Kontrollkaninchen ein Lungenempyem vorlag, wurde es bei den Untersuchungen nicht berücksichtigt, so daß folgende Versuchstiere in die Untersuchung mit einbezogen wurden:

3	mit Herzhomogenat,
4	mit Herzmyosin
3	mit Skelettmuskelmyosin
2	mit Sarkolemmanreicherung und
2	mit Perikardextrakt immunisierte sowie
3	Kontrollkaninchen
insgesamt 17	Versuchstiere

3.3 Antikörpervermittelte Immunreaktionen

3.3.1 Nachweis zirkulierender Autoantikörper im indirekten Immunfluoreszenztest

3.3.1.1 Nachweis der Bindung zirkulierender Antikörper an Kryostatschnitten

Vor Immunisierung der Versuchstiere waren keine Antikörper nachweisbar. Die nach der Immunisierung in den Seren der Versuchstiere nachweisbaren organunspezifischen und muskelspezifischen Antikörper sind in Tabelle 1 aufgeführt. Im Gegensatz zum Kontrollansatz, mit nicht behandelten Kaninchen fällt auf, daß organunspezifische Antikörper gegen Gefäßendothel (AEA) auch bei allen mit Freundschem Adjuvans behandelten Tieren nachweisbar waren. Muskelspezifische Antikörper fanden sich nur bei den mit Myokard- oder Skelettmuskel-Antigenen immunisierten Kaninchen. Bei den mit Herzhomogenat immunisierten Tieren fanden sich antisarkolemmale (ASA), antifibrilläre (AFA) und antiinterfibrilläre (IFA) Antikörper sowie Antikörper gegen Z-Streifen in unterschiedlicher

Nachweis antimyokardialer Antikörper an Kryostatschnitten

Antigen zur Immunisation	Organunspez. Ak.	Myokard-Ak.	Skelettmuskel-Ak.
Herzhomogenat (n=3)	AEA+	ASA++/+	ASA++/+
		AFA +	AFA+
		IFA +	
		Z-Streifen ++	
Sarkolemmpräparation (n=2)	AEA+	ASA++/+++	ASA++
		AFA+	AFA(+)
Herzmyosin (n=4)	AEA+	ASA+/(+)	ASA(+)
		AFA(Myosin)+++/++	AFA +
Perikardextrakt (n=2)	AEA+/(+)	ASA+++	ASA++
		Z-Streifen++	
Skelettmuskelmyosin (n=3)	AEA+	AFA(+)/0	AFA++/+
			ASA(+)
Freundsches Adjuvans (n=3)	AEA+/0	0	0
Kontrollseren (n=2)	0	0	0

Tabelle 1:
Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung an Kryostatschnitten (AEA = Antiendotheliale Antikörper, ASA = Antisarkolemmale Antikörper, AFA = Antifibrilläre Antikörper, IFA = Antiinterfibrilläre Antikörper, Z-Streifen = Antikörper gegen Z-Streifen; 0, (+), +, ++, +++ = Stärkegrade der Fluoreszenz).

Fluoreszenzintensität sowohl an Myokard-, als auch an Skelettmuskelantigenen. Der überwiegende Antikörpertyp der mit Sarkolemm und Perikardextrakt immunisierten Versuchstiere war antisarkolemmal in hohen Titern. Auch die mit myokardialem Myosin immunisierten Tiere induzierten antisarkolemmale Antikörper. Überwiegender Antikörpertyp war bei diesen Tieren der antifibrilläre Antikörper vom Antimyosintyp. Im Vergleich zu den Versuchstieren, die mit Skelettmyosin geboostert wurden, war die Bindung antifibrillärer Antikörper bei den mit Herzmyosin immunisierten Tieren myokardspezifisch, bei den mit Skelettmyosin immunisierten Versuchstieren skelettmuskelspezifisch. In Abbildung 8 findet sich das typische Antikörpermuster eines mit Herzhomogenat immunisierten Kaninchens (ASA-positiv, AFA-positiv, IFA-positiv), in Abbildung 9 der serologische Befund eines mit myokardialem Myosin immunisierten Kaninchens (ASA-positiv, AMyAk (=Antimyosinantikörper)- positiv).

3.3.1.2 Nachweis der Bindung zirkulierender Antikörper an azetonfixierten Rattenkardiozyten

Die Untersuchungen an isolierten Rattenkardiozyten, deren bindegewebigen Basalmembrananteile durch die Kollagenasebehandlung bei der Kardiozytenisolation entfernt worden war, ergaben für die mit Herzhomogenat, Herzmuskelsarkolemm und Perikard immunisierten Tiere den Nachweis hochtitriger antimyolemmaler Antikörper. Mit myokardialem Myosin immunisierte Tiere zeigten eine niedertitrige antimyolemmale Fluoreszenz. Die mit Herzmuskelmyosin immunisierten Versuchstiere zeigten die höchsten Titer von Antimyosin-Antikörpern, die durch eine breite Fluoreszenz der A-Bande gut von Antiaktin-Antikörpern differenzierbar waren (Doppelstreifen). Erwartungsgemäß ließen sich Antimyosin-Antikörper auch bei

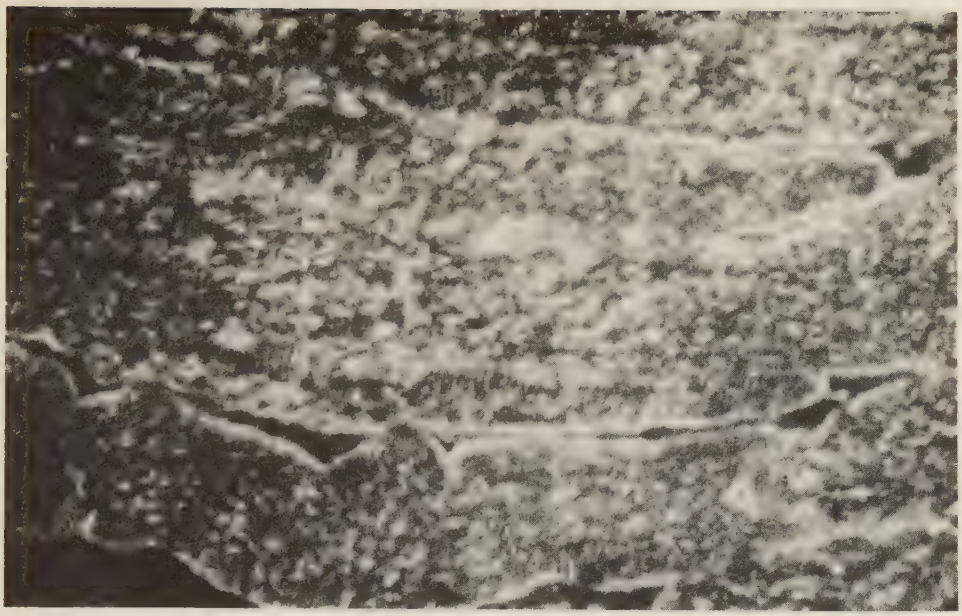


Abbildung 8:
Antikörper gegen Fibrillen (AFA), Interfibrillärsubstanz (IFA), und Sarkolemm (ASA) bei einem mit Herzhomogenat immunisierten Kaninchen

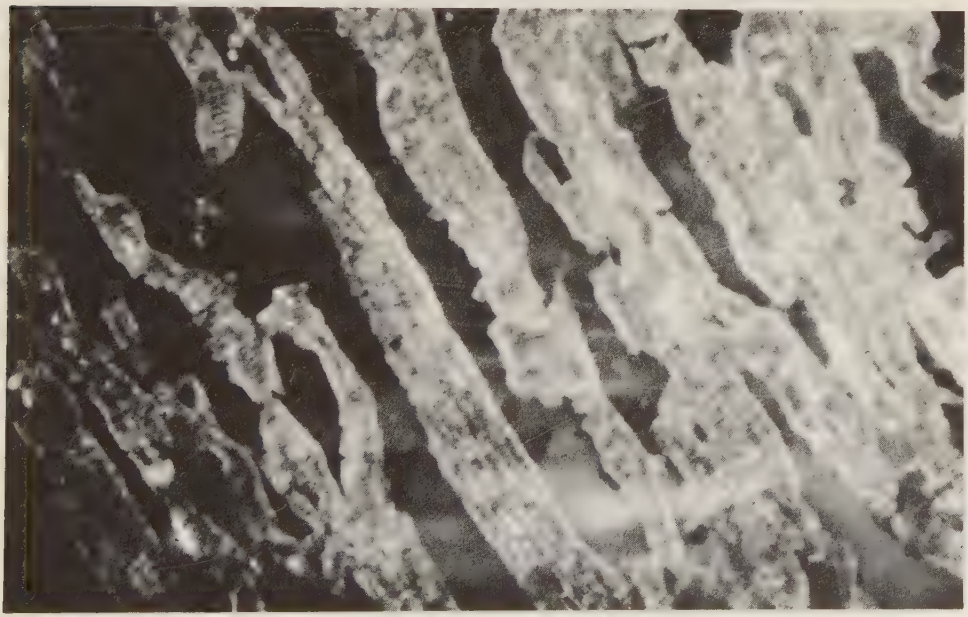


Abbildung 9:
Nachweis von Antikörpern gegen Sarkolemm (ASA) und Myosin (AMyAk) bei einem mit myokardialem Myosin immunisierten Kaninchen

Nachweis antimyokardialer Antikörper an azetonfixierten Kardiozyten

Antigen zur Immunisation	AMLA	AMyAk	AAktAk	IFA	Z-Streifen
Herzhomogenat (n=3)	+++	++	+	+	+
Sarkolemmpräparation (n=2)	++	+	?	0	(+)
Herzmyosin (n=4)	+	+++	0	0	+
Perikardextrakt (n=2)	+	0	0	0	0
Skelettmuskelmyosin (n=3)	0	?/(+)	0	0	0
Freundsches Adjuvans (n=3)	0	0	0	0	0
Kontrollseren (n=2)	0	0	0	0	0

Tabelle 2:
Indirekter Immunfluoreszenztest an azetonfixierten Rattenkardiozyten nach Immunisierung mit kardialen Antigenen (AMLA = Antimyolemmale Antikörper, AMyAk = Antimyosin-Antikörper, AAktAk = Antiaktin-Antikörper, Z-Streifen = Antikörper gegen Z-Streifen, IFA = Antikörper gegen Interfibrillärsubstanz)

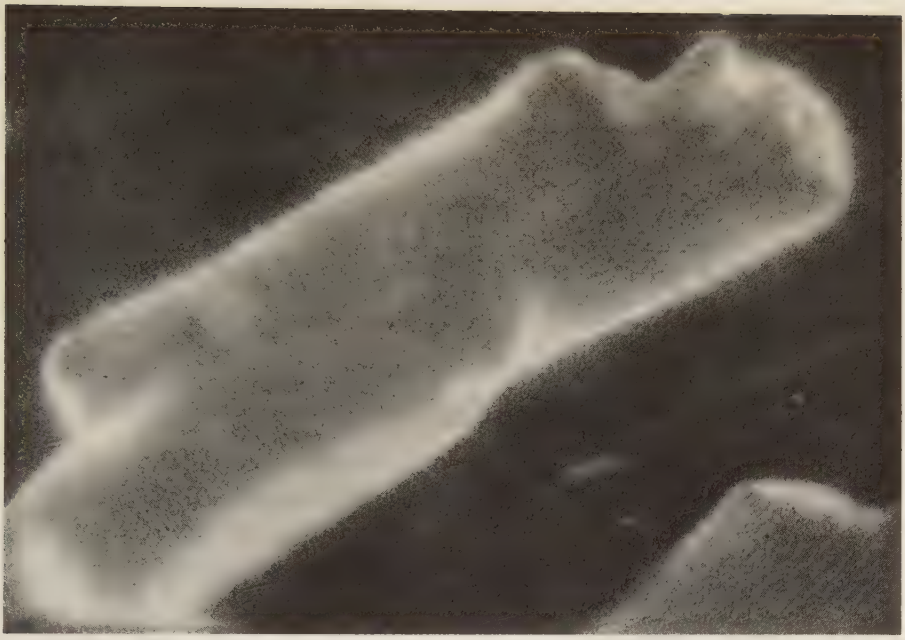


Abbildung 10:
Antimyolemmale Antikörper (AMLA) nachgewiesen an azetonfixierten Rattenkardiozyten (Serum von eines Sarkolemm immunisierten Versuchstiers)

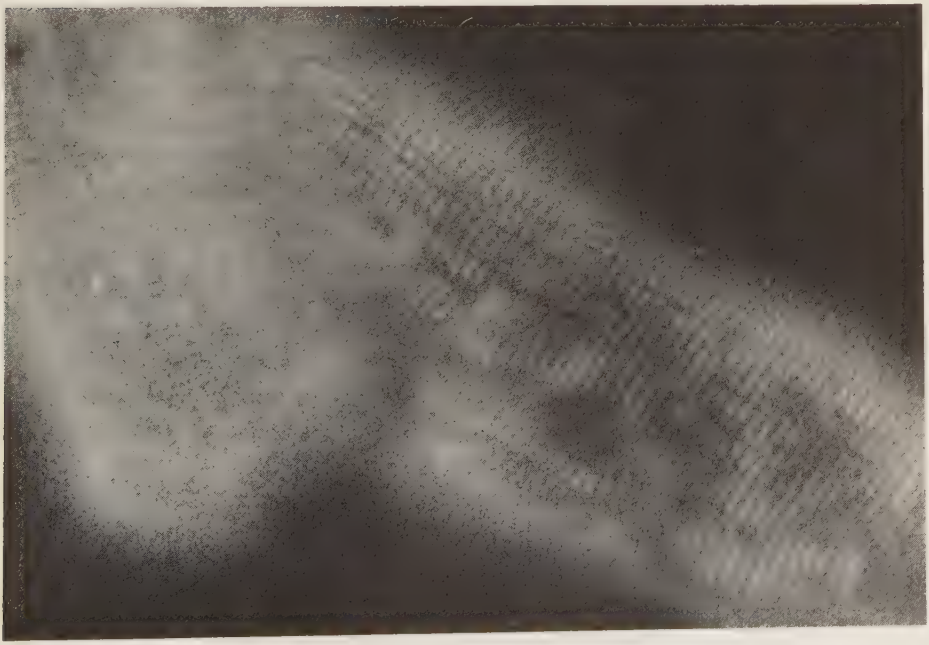


Abbildung 11:
Antimyosin-Antikörper (AMyAk) nachgewiesen an azetonfixierten Rattenkardiozyten (Serum eines mit kardialem Myosin immunisierten Versuchs-

den mit Herzhomogenat immunisierten Versuchstieren nachweisen. (Tabelle 2). Abbildung 10 zeigt den typischen Befund der mit Sarkolemm immunisierten Versuchstiere als lineare Fluoreszenz des Myolemms und Abbildung 11 die Fixierung von Antikörpern gegen die A-Bande an azetonfixierte Rattenkardiozyten (AMyAk-positiv).

3.3.1.3 Nachweis der Bindung zirkulierender Antikörper an vitalen Rattenkardiozyten

Die indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen an vitalen Rattenkardiozyten ergaben für alle untersuchten Seren lediglich den Nachweis antimyolemmaler Antikörper. Antikörper gegen intrazelluläre Antigene konnten die Membran vitaler Herzmuskelzellen nicht permeieren.

3.3.2 Solid-Phase-Fluorometric-Assay (SPFA) auf spezifische Antimyosin-Antikörper

Während vor der Immunisierung bei keinem der Versuchstiere Antimyosin-Antikörper nachweisbar waren, konnten bei den mit Myosin immunisierten Tieren nach der letzten Immunisierung Antikörpertiter bis 1:640 entsprechend 184 FSU nachgewiesen werden. Auch nach Immunisierung mit Herzhomogenat (Abbildung 12, rechte Seite) fanden sich im SPFA Antimyosin-Antikörper mit 102 FSU (entsprechend einem Titer von 1:80 in der IFL). Dagegen ließ sich in den Seren der mit Perikardextrakt und Freundschem Adjuvans behandelten Tier kein nennenswerter Anstieg der Fluoreszenzsignale messen. Bei einem mit Myosin immunisierten Versuchstier wurden die Fluoreszenzintensitäten im Verlauf der Immunisierung im SPFA und im indirekten Immunfluoreszenztest gemessen und mit dem Titer der Komplementbindungsreaktion verglichen (Abbildung 13). Bereits nach der ersten Immunisierung waren niedertitrige Antimyosin-Antikörper vorhanden, die in der Komplementbindungsreaktion einen Titer von 1:16 aufwiesen. Die Entwicklung der Komplementbindungsreaktionstiter und der

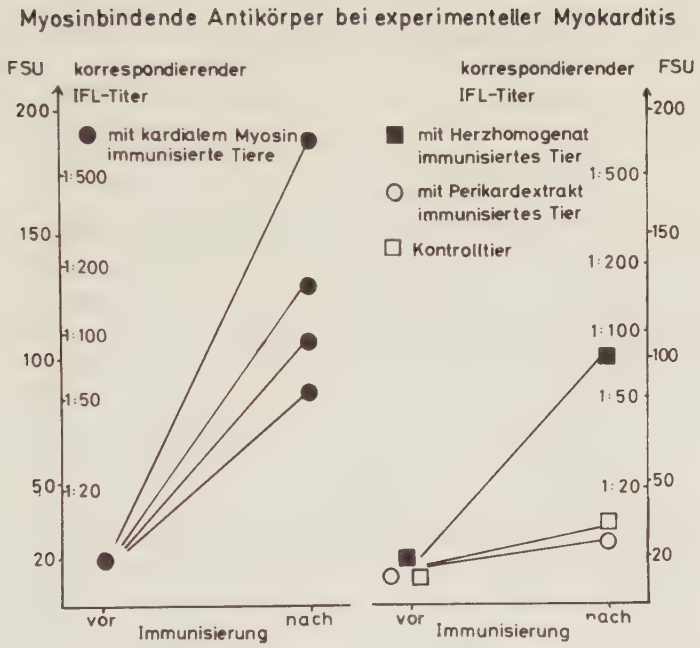


Abbildung 12:
Antimyosin-Antikörper nach Immunisierung mit kardialen Antigenen

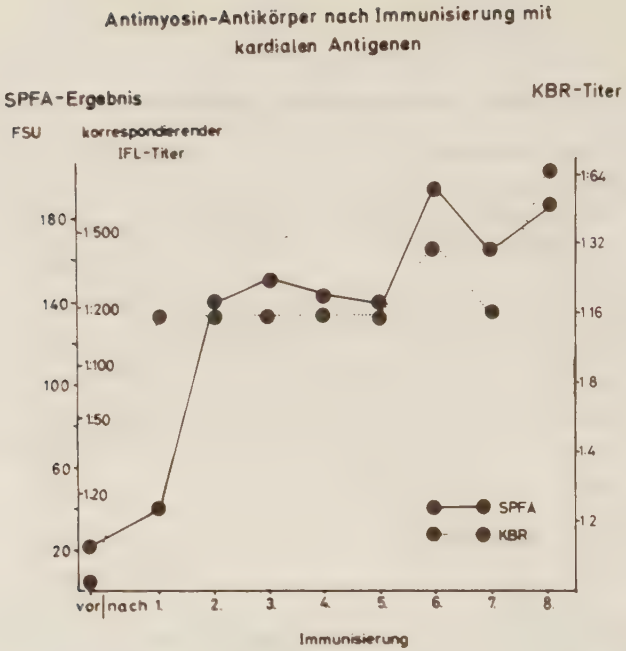


Abbildung 13:

Vergleich der Titerhöhe an Antimyosin-Antikörpern im SPFA und in der KBR im Verlauf der Immunisierung mit kardialem Myosin

"Fluorescence Signal Units" (FSU) des SPFA verlief weitgehend parallel (r = 0,64; p 0,25). Höchste Titerstufen bzw. Fluoreszenzintensitäten konnten ebenso wie die höchsten Komplementbindungsreaktionstiter nach der letzten Immunisierung gemessen werden. Der SPFA auf Antimyosin-Antikörper zeigte eine gute Sensitivität und eine zufriedenstellende Spezifität. Die Intraassayvarianz positiver Seren im mittleren Intensitätsbereich betrug 7,8 %.

3.3.3 Immundiffusionstest

Vor der Immunisierung ergab kein Serum eine Präzipitationslinie. Danach prägten sich in den einzelnen Versuchsgruppen unterschiedliche Präzipitationsmuster aus:

3.3.3.1 Typ 1: Mit Herzmyosin immunisierte Tiere

Die Seren dieser Versuchstiere zeigten im KCl-Agar stets drei Identitätslinien gegen Herzhomogenat, Sarkolemmpräparation und myokardiales Myosin. Eine schwache Bande gegen Perikardextrakt war bei 2 von 4 Kaninchen nachweisbar. Bei allen Versuchen mit Herzhomogenat und Sarkolemmpräparation bildete sich um das antigenhaltige Loch zusätzlich ein konzentrischer Hof, der auch dann auftrat, wenn kein Serum zugegeben wurde (Artefakt). Im NaCl-Agar zeigte sich ein entsprechendes Bild: 2 und 3 Banden gegen Herzhomogenat, eine inkonstante Bande gegen Perikard (Abbildung 14).

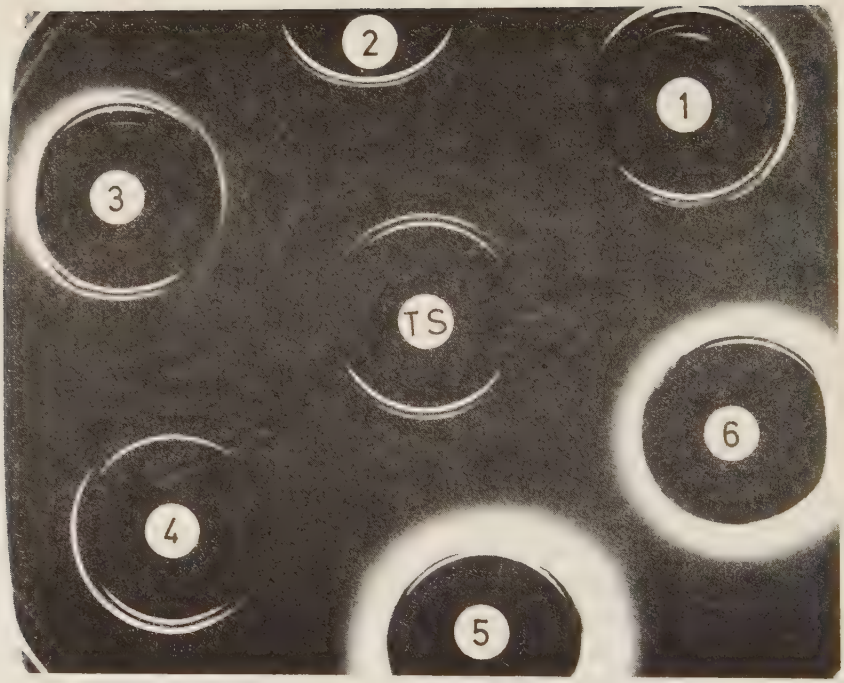


Abbildung 14:

Immundiffusionstest nach Immunisierung mit Herzmyosin im KCl-Agar

TS: Testserum

1. Herzmyosin (6 mg/ml)
2. Skelettmyosin (6 mg/ml)
3. Perikardextrakt (7 mg/ml)
4. 0,6 m KCl
5. Sarkolemmpräp. (7 mg/ml)
6. Herzhomogenat (7 mg/ml)

3.3.3.2 Typ 2: Mit Herzhomogenat und Sarkolemm immunisierte Tiere

Die Seren dieser Versuchstiere zeigten im NaCl-Agar das in Abbildung 15 abgebildete Muster: die Titer der Sarkolemm-Tiere waren geringer als bei den mit Herzmuskelhomogenat behandelten Versuchstieren. Maximal 6 Bande waren nachweisbar, 4 waren mit Perikardextrakt identisch, 2 Bande zeigten Linien der Identität zu Herzmuskelmyosin. Gegen Skelettmuskelmyosin war mit diesen Seren keine Reaktion nachweisbar.

3.3.3.3 Typ 3: Mit Perikard immunisierte Tiere

Die Seren dieser Tiere bildeten gegen myokardiales Myosin keine Bande. Linien der Identität zeigten sich gegenüber Herzhomogenat und Sarkolemmpräparation bei 4 Banden, wobei 2 nur schwach ausgeprägt waren (Abbildung 16).

3.3.3.4 Typ 4: Mit Skelettmuskelmyosin immunisierte Tiere

Die Seren dieser Tiere zeigten gegen keines der kardialen Antigene Präzipitationslinien. Ebenso fehlten Präzipitationslinien gegen Skelettmuskelmyosin.

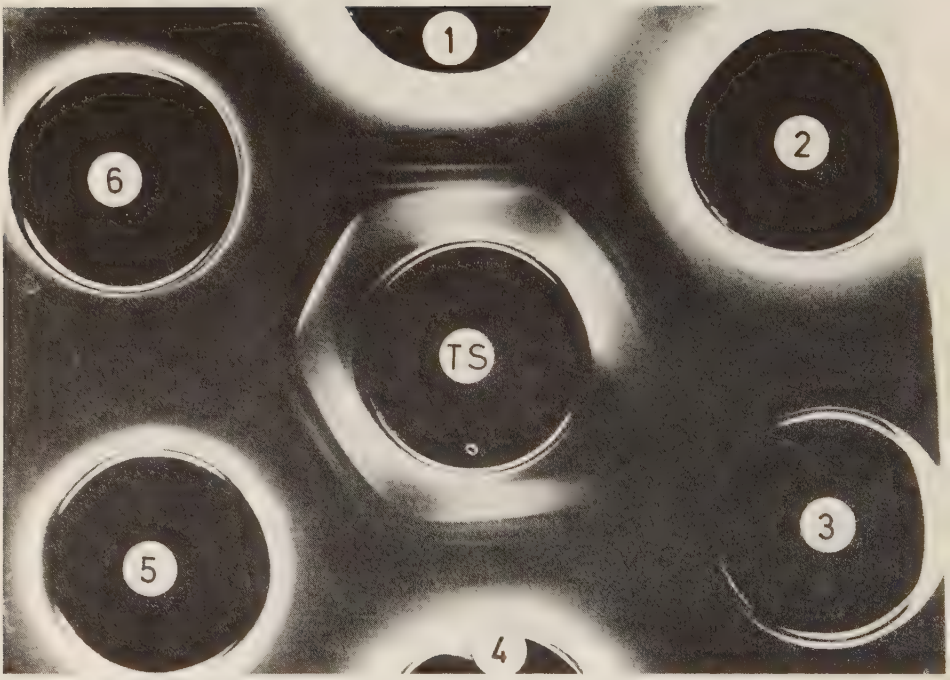


Abbildung 15:

Immundiffusionstest im NaCl-Agar nach Immunisierung mit Herzhomogenat

TS: Testserum

1. Herzhomogenat 7 mg/ml
2. Sarkolemmpräp. 7 mg/ml
3. Saline
4. Herzhomogenat 3,5 mg/ml
5. Sarkolemmpräp. 3,5 mg/ml
6. Perikardextrakt 7 mg/ml

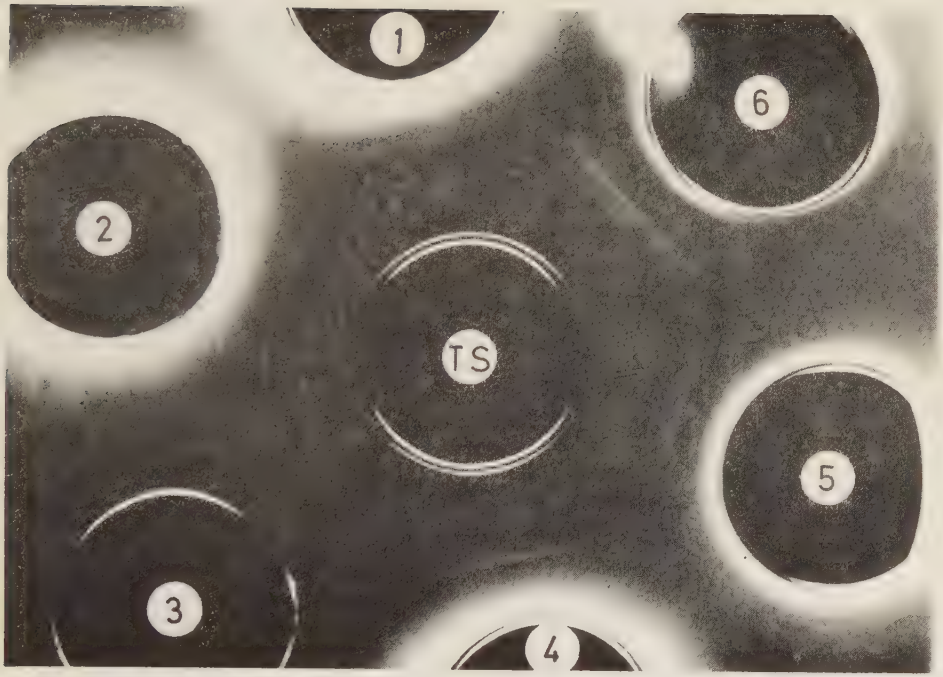


Abbildung 16:

Immundiffusionstests im NaCl-Agar nach Immunisierung mit Perikardextrakt

TS: Testserum

1. Herzhomogenat (7 mg/ml)
2. Sarkolemmpräp. (7 mg/ml)
3. Saline
4. Herzhomogenat (3,5 mg/ml)
5. Sarkolemmpräp. (3,5 mg/ml)
6. Perikardextrakt (7 mg/ml)

3.3.3.5 Kontrolltiere

Die Seren der Kontrolltiere, die mit Saline oder Freundschem Adjuvans immunisiert worden waren, zeigten keine Präzipitationslinien gegen die Herz- oder Skelettmuskelantigene.

3.3.4 Komplementbindungsreaktion mit Herzmyosin als Antigen

Wie unter 2.4.4 ausgeführt, waren einige der Seren antikomplementär, d.h. sie fixierten Komplement, ohne daß Antigen zugegeben wurde. Deshalb mußten Serumleerwerte als Kontrollen mitgetestet werden. Bei ihrer Auswertung ergab sich, daß die Seren der mit Herzmyosin, Skelettmuskelmyosin und der Kontrolltiere, keine Hämolyseinhibition aufwiesen, außer durch unspezifische Agglutination (vgl. 2.2.4) bei hohen Serumkonzentrationen (bis zu einem Titer von max. 1:8). Im Gegensatz dazu führten die Seren der mit Herzhomogenat, Sarkolemmpräparation und Perikardextrakt immunisierten Tiere zu echten Fixationen bis zu Titerstufen von 1:256. Abbildung 17 zeigt die Antikomplementarität der Seren im Verlauf der Immunisierung mit Herzhomogenat, Sarkolemmpräparation und Perikardextrakt.

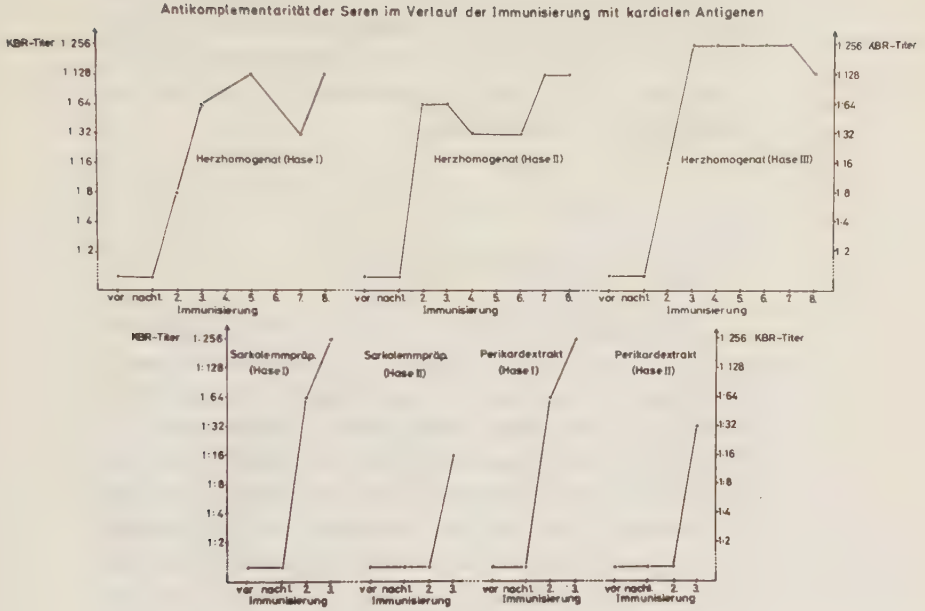


Abbildung 17:

Titer der Antikomplementarität der Seren im Verlauf der Immunisierung mit kardialen Antigenen

Eine Auswertung der Titerstufen von komplementbindenden spezifischen Antimyosin-Antikörpern konnte deshalb nur an den Seren der mit Herz- und Skelettmyosin immunisierten Kaninchen und an den Kontrolltieren durchgeführt werden. Die Seren der mit kardialem Myosin immunisierten Tiere induzierten echte Fixationen mit Titern bis 1:64. Abbildung 18 zeigt die Titer im Laufe der Immunisierung bei den vier mit Herzmyosin immunisierten Tiere.

3.3.5 Antikörpervermittelte Zytolyse (AMC)

Die Untersuchung der Seren auf eine kardiozytolytische Aktivität ergab bei allen Seren der gegen Herzhomogenat immunisierten Tiere nach der Immunisierung einen deutlichen Abfall des Zytolyseindex (AMC positiv). Dagegen wies nur 1 Serum der beiden gegen Sarkolemm immunisierten Tiere eine zytolytische Aktivität auf. 1 Serum der gegen Herzmyosin immunisierten Tiere induzierte gleichfalls eine Lyse isolierter Kardiozyten. Dagegen induzierte kein Serum der mit Skelettmyosin, Perikardextrakt oder Freundschem Adjuvans allein behandelten Tiere eine Kardiozytolyse. Nur Seren, in denen sich auch antimyolemmale Antikörper in höheren Titerstufen fanden, lysierten vitale Kardiozyten (Abbildung 19). Die Intensität der Kardiozytolyse nahm mit der Anzahl der Immunisierungen zu, wie Abbildung 20 für ein mit Herzmuskelhomogenat immunisiertes Tier zeigt. Eine signifikante zytolytische Aktivität trat häufig bereits nach der 3. Boosterung auf.

Im Kontrollansatz mit Hepatozyten ergab sich dagegen keine zytolytische Aktivität. Diese Zytolyseindices lagen zwischen 0,95 und 1,14.

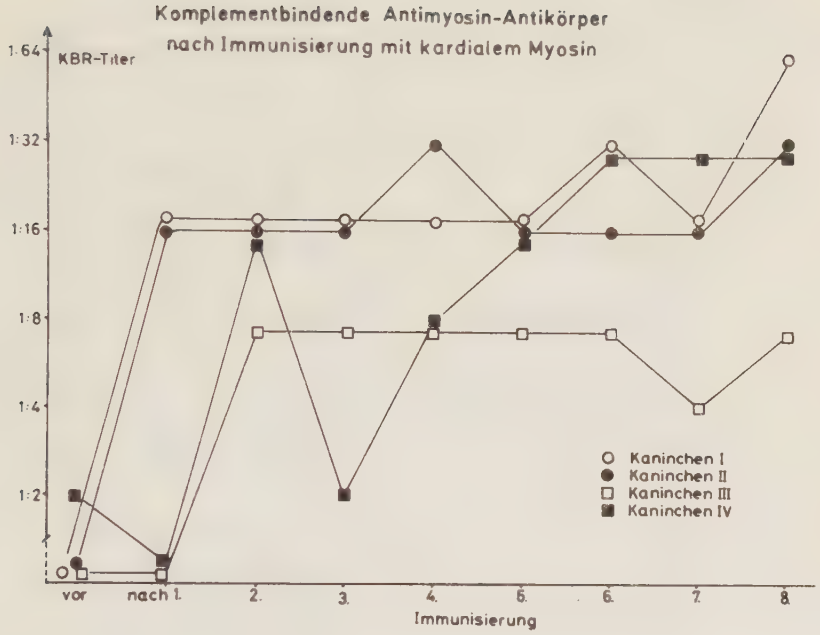


Abbildung 18:

Titer der komplementbindenden Antimyosin-Antikörper im Verlauf der Immunisierung mit Herzmyosin

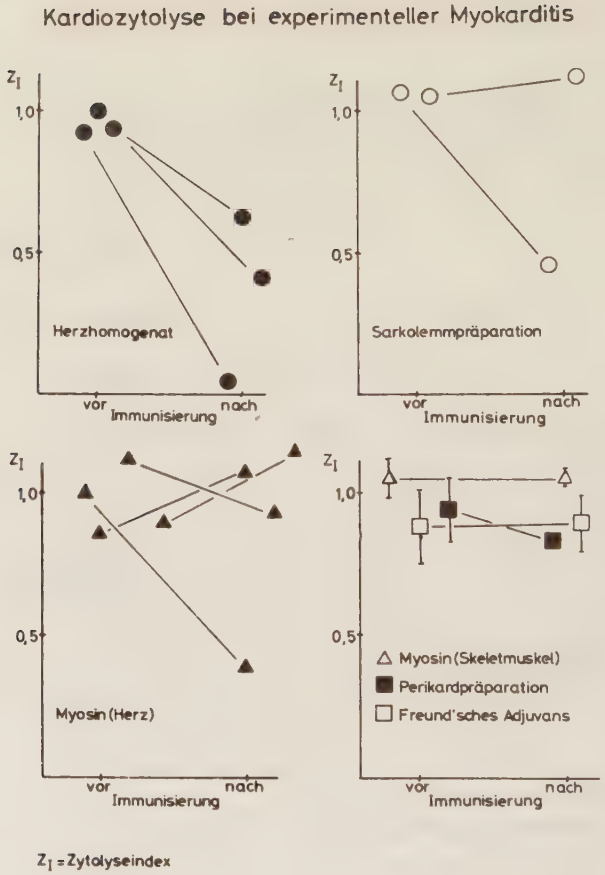


Abbildung 19:

Kardiozytolyseindizes vor und nach der Immunisierung mit kardialen Antigenen

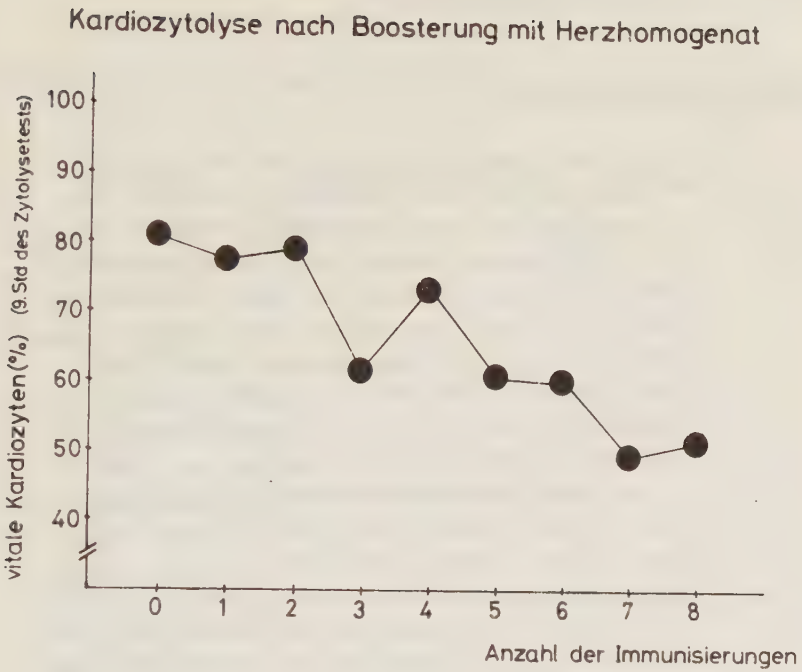


Abbildung 20:

Verlaufsbeobachtung des Zytolysegrades in den Seren eines mit Herzhomogenat immunisierten Versuchstieres

3.4 Zellvermittelte Immunreaktion

3.4.1 Intradermalteste

Vor der Immunisierung zeigte keines der Tiere eine positive Reaktion auf die später verwendeten Antigene. Danach entwickelten alle Kaninchen, die gegen Herzmyosin und Herzhomogenat immunsiert wurden, einen positiven Hauttest des Stärkegrads 3. Ein Kaninchen, das gegen Perikardextrakt immunisiert wurde, entwickelte eine Reaktion des Stärkegrads 1 nach zwei Immunisierungen. Negative Hautteste waren bei den Tieren, die mit Sarkolemmanreicherung, Skelettmyosin und NaCl 0,9 % geboostert wurden, zu verzeichnen (Tabelle 3). Der Umschlag zum positiven Intradermaltest sowie der Anstieg der Reaktionsstärke verlief bei den einzelnen Gruppen nicht synchron (Abbildung 21). Der erste positive Hauttest fand sich nach der zweiten Immunisierung, nach der 6. Immunisierung waren alle der mit Herzmyosin und Herzhomogenat immunisierten Tiere bis Stärkegrad 3 positiv. Tiere, die mit Skelettmuskelmyosin immunisiert wurden, blieben auch nach der 7. Immunisierung alle negativ.

3.4.2 Lymhozytenisolierung

Zur Bestimmung der Reinheit und der Ausbeute der Lymphozytenpräparation wurden fünf Kontrolltiere verwendet. Ihre Leukozytenzahl im peripheren Blut schwankte zwischen 8500 und 11000/ul (Mittelwert 9400/ul).

Intrakutantest bei experimenteller Myokarditis

Antigen	positive Reaktionen	Stärkegrad
Herzhomogenat n=3	3	3
Herzmyosin n=4	4	3
Sarkolemmpräp. n=2	0	-
Perikardextrakt n=2	1	1
Skelettmyosin n=3	0	-

Tabelle 3:
Intrakutantests nach Immunisierung mit kardialen Antigenen

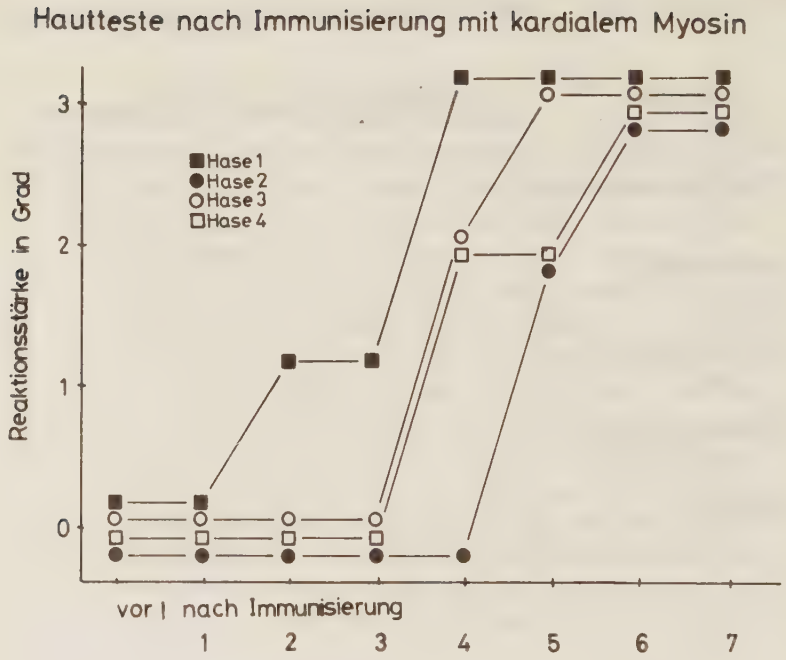


Abbildung 21:

Reaktionsstärke der Intrakutantests im Verlauf der Immunisierung mit Herzmyosin

Das Differentialblut in der Pappenheimfärbung zeigte:

59 - 73 % (67%) kleine mononukleäre Zellen (Lymphozyten)
7 - 13 % (9%) große mononukleäre Zellen
19 - 31 % (23 %) polymorphkernige Zellen

Nach der Gradientenzentrifugation in Ficoll fanden sich im Ausstrich der Lymphozytensuspension nur noch vereinzelt polymorphkernige Zellen (0 - 2 %, Mittelwert <1 %). Die Ausbeute an mononukleären Zellen war im Vergleich zu menschlichen Lymphozyten relativ gering (10 - 15 %, 13,6 %). Sie reichte aber für diese Untersuchungen aus.

Die Vitalität der isolierten Lymphozyten mit der Acridinorange-Färbung betrug zwischen 82 und 91 %.

3.4.3 Lymphozytotoxische Reaktionen gegen Kardiozyten

Lymphozytotoxische Reaktionen gegen vitale adulte Rattenkardiozyten wurden bei den mit Herzmyosin und Herzhomogenat immunisierten Tieren und zwei Kontrolltieren bestimmt. Es fand sich keine nachweisbare direkte Zytotoxizität (LC) gegen heterologe Zielzellen (Abbildung 22).

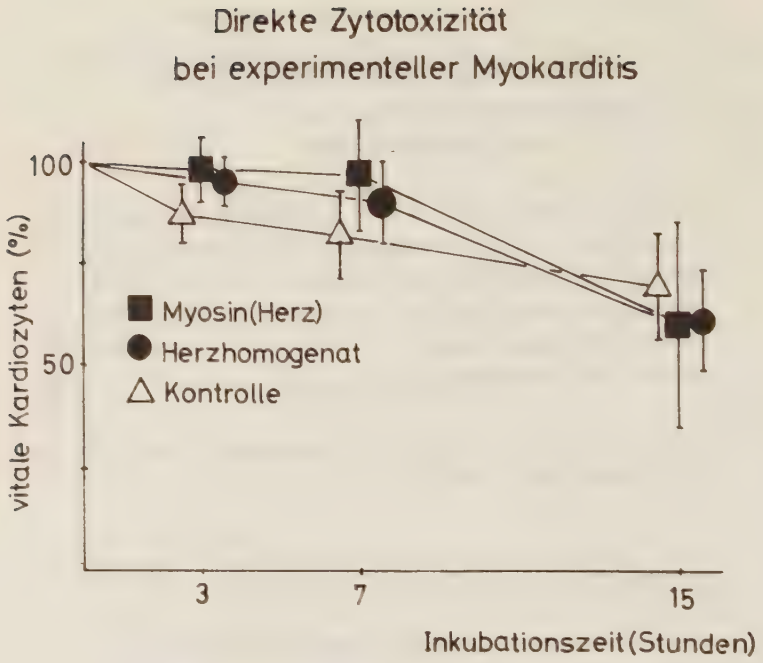


Abbildung 22:

Lymphozytotoxische Reaktionen nach Immunisierung mit Herzmyosin und Herzhomogenat. Im Vergleich zu nicht immunisierten Kontrolltieren konnte keine zytotoxische Reaktion gegen heterologe Kardiozyten nachgewiesen werden.

3.4.4 Antikörpervermittelte lymphozytotoxische Reaktion (ADCC) gegen Kardiozyten

3.4.4.1 Autologer Ansatz

Im autologen Ansatz fand sich bei den mit Herzmoysin und Herzhomogenat immunisierten Tieren keine spezifische, gegen adulte Rattenkardiozyten gerichtete, zytotoxische Aktivität der Lymphozyten.

3.4.4.2 Homologer Ansatz

Auch im homologen Ansatz, der bei allen Versuchsgruppen durchgeführt wurde, war keine gegen adulte Rattenkardiozyten gerichtete Zytotoxizität nachweisbar (Abbildung 23). Die t_{50i} der Kardiozyten bei Inkubation mit Lymphozyten und Testserum unterschied sich nicht von der t_{50o} unter Verwendung von Serum vor der Immunisierung oder bei Inkubation mit Lymphozyten allein.

3.4.5 Antigeninduzierte Stimulation der Lymphozyten

Bei der antigeninduzierten Stimulation der Lymphozytenproliferation zeigte sich bei den mit Herzmyosin immunisierten Tieren eine positive Reaktion. Die Proliferation der Lymphozyten war abhängig von der Konzentration des Antigens. Die höchsten Stimulationsindizes lagen bei Antigenkonzentrationen von 20 - 50 ug Myosin/ml der Kultur. Die positive Antwort auf Myosin war sowohl im autologen, als auch im heterologen Serum gleich stark ausgeprägt.

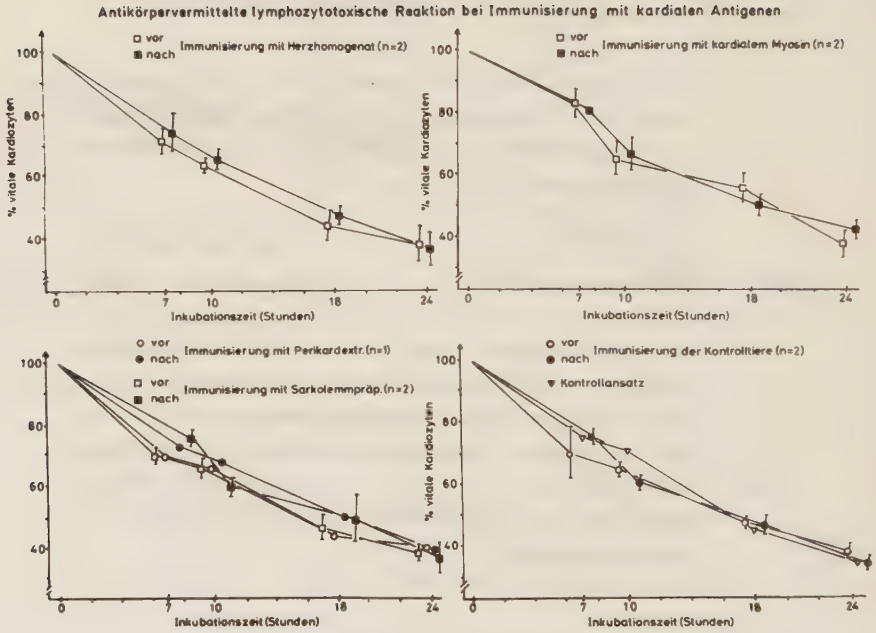


Abbildung 23:

Antikörperabhängige lymphozytotoxische Reaktionen vor und nach Immunisierung mit kardialen Antigenen. Vor und nach Immunisierung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der ADCC gegen heterologe kardiale Zielzellen.

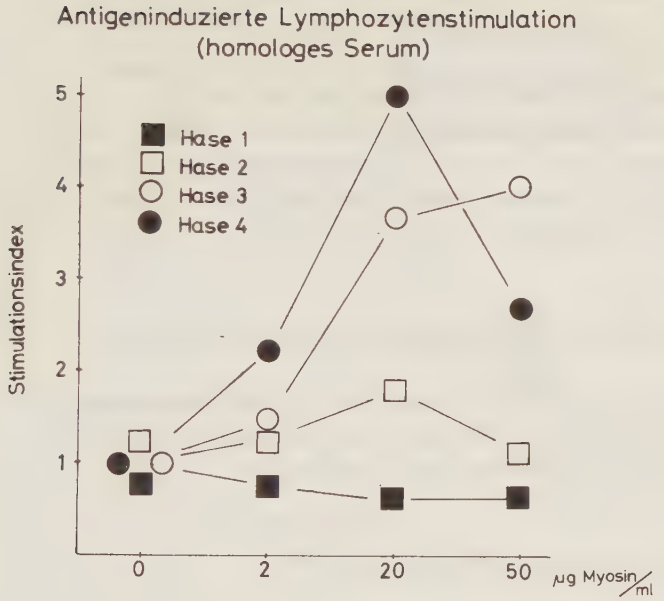


Abbildung 24:
Antigeninduzierte Lymphozytenstimulation durch Herzmyosin im homologen Serum

3.4.6 Phytohämagglutinin-induzierte Stimulation der Lymphozyten

Die Stimulierbarkeit der Lymphozyten nach der Immunisierung wurde nur bei den mit Herzmyosin und Herzhomogenat immunisierten Tieren und bei zwei Kontrollkaninchen durchgeführt. Die Stimulierbarkeit der immunisierten Tiere war im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich herabgesetzt (Abbildung 25). Während der Mittelwert der Kontrolltiere sich kaum von 0,99 auf 0,90 nach der Immunisierung änderte, sank der Wert bei den mit Herzmyosin behandelten Tieren von 1,23 vor, auf 0,48 nach der Immunisierung und bei den mit Herzhomogenat behandelten Tieren von 0,80 auf 0,26.

3.5 Untersuchung auf immunsuppressive Faktoren im Serum (SIF)

Eine signifikante Inhibition der PHA-induzierten Blastentransformation ließ sich bei einigen Schwankungen im Verlauf der Immunisierungen nicht beweisen (Abbildung 26).

3.6 Nachweis zirkulierender Immunkomplexe

Vor der Immunisierung waren in keinem der untersuchten Seren zirkulierenden Immunkomplexe vorhanden. Bereits nach der ersten Boosterung traten zirkulierende Immunkomplexe auf. Den geringsten Anstieg der Immunkomplexkonzentrationen zeigten die mit Herzmyosin und der Sarkolemmanreicherung immunisierten Versuchstiere, während hohe Immunkomplexkonzentrationen im späten Verlauf der Immunisierungen mit Herzhomogenat und Perikardextrakt nachgewiesen werden konnten (Abbildung 27). Die Antikomplementarität der Seren in der Komplementbindungsreaktion (vgl. Abbildung 17) deckte sich in fast allen Seren mit dem Nachweis zirkulierender Immunkomplexe.

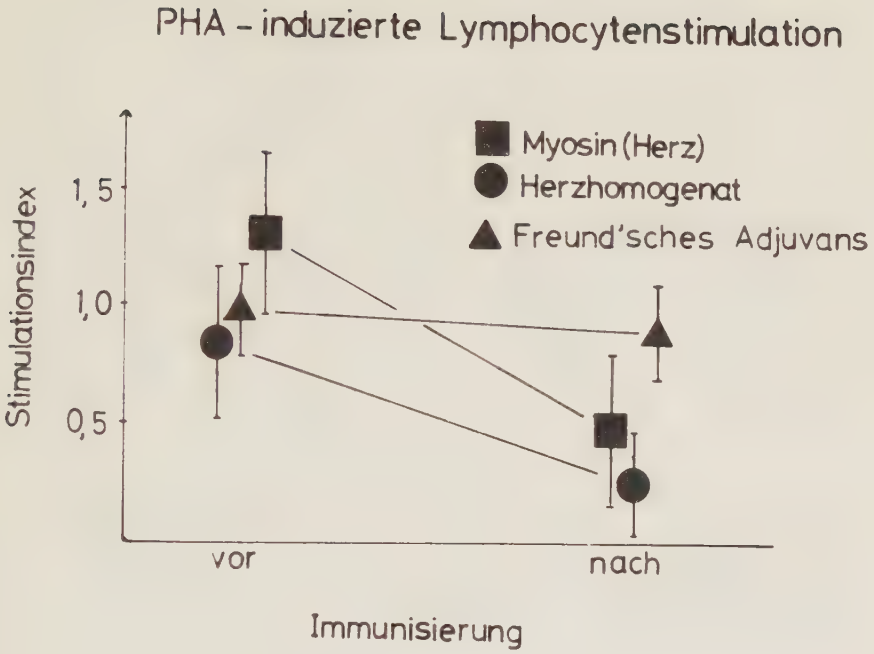


Abbildung 25:
Phytohämagglutinin-induzierte Lymphozytenstimulation vor und nach der Immunisierung mit Herzmyosin und Herzhomogenat.

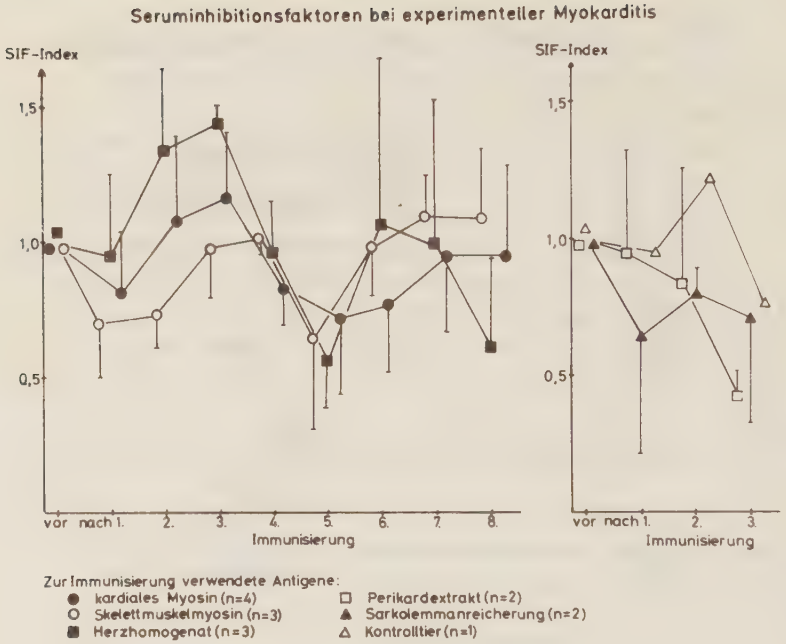


Abbildung 26:

Untersuchungen auf immunsuppressive Faktoren nach Immunisierung mit kardialen Antigenen

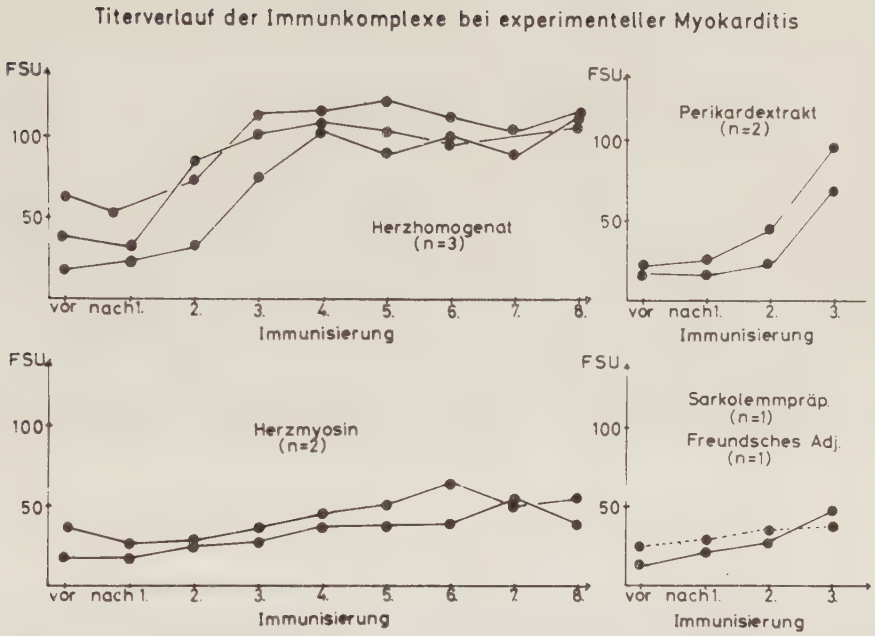


Abbildung 27:

Titer der Immunkomplexe im Serum im Verlauf der Immunisierung mit kardialen Antigenen

3.7 Histologische Untersuchungen

3.7.1 Hämatoxylin-Eosin- und Van-Gieson-Färbungen

In den Hämatoxylin- und Van-Gieson-Färbungen der histologischen Präparate waren fokale mononukleäre Infiltrate um Muskelfasernekrosen das typische Korrelat für die ablaufende Myokarditis (Abbildung 28). Im Skelettmuskel ließen sich, wenn auch in geringerer Ausprägung, ähnliche Infiltrate bei den mit Skelettmuskelmyosin immunisierten Tiere zeigen (Abbildung 29). Die Van-Gieson-Färbungen ergaben bei den mit Herzhomogenat immunisierten Tieren eine vermehrte interstitielle Fibrose als Hinweis auf die bereits einsetzenden reparativen Vorgänge (Abbildung 30). Tabelle 4 zeigt, daß Infiltrate und Nekrose an Herz und Skelettmuskel typisch für die mit Myokardhomogenat immunisierten Tiere war, während diese Veränderungen bei den mit Perikardextrakt und Sarkolemmanreicherung immunisierten Tiere fehlten. Die Spezifität der zellulären entzündlichen Reaktionen nach der Immunisierung mit Herz- bzw. Skelettmuskelmyosin ließ sich aus der Tatsache ableiten, daß die mit Herzmyosin immunisierten Tiere Infiltrate und Nekrosen am Myokard, aber nicht am Skelettmuskel aufwiesen, während bei den mit Skelettmuskelmyosin geboosterten Versuchstieren, lediglich eine veränderte Morphologie des Skelettmuskels vorlag. Zelluläre Infiltrationen an Myokard und Skelettmuskel fanden sich bei den Kontrolltieren nicht.

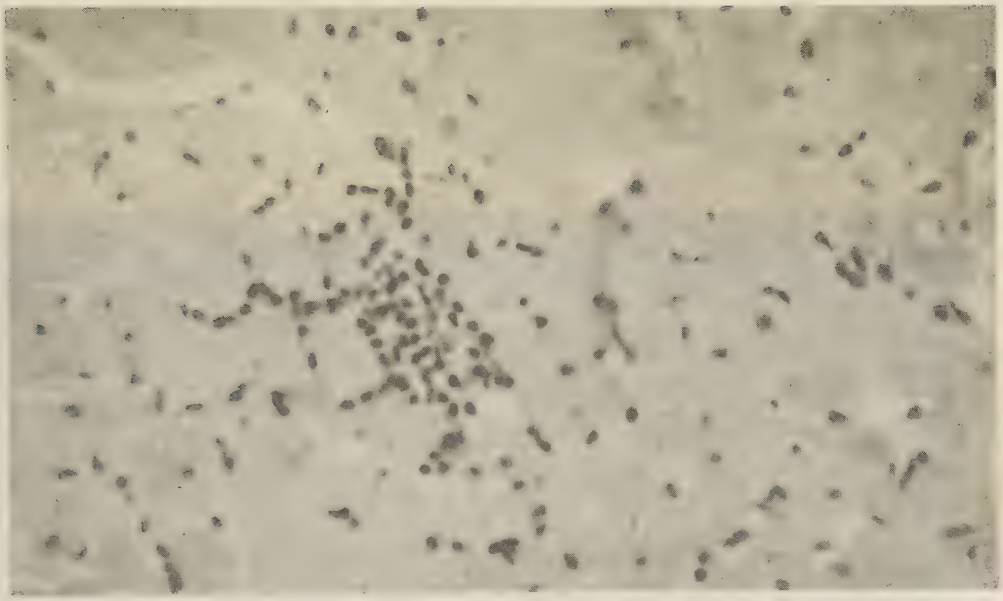


Abbildung 28:
Fokale Myokarditis nach Immunisierung mit Herzhomogenat (HE-Färbung)

Abbildung 29:
Fokale Myositis nach Immunisierung mit Herzhomogenat (HE-Färbung)

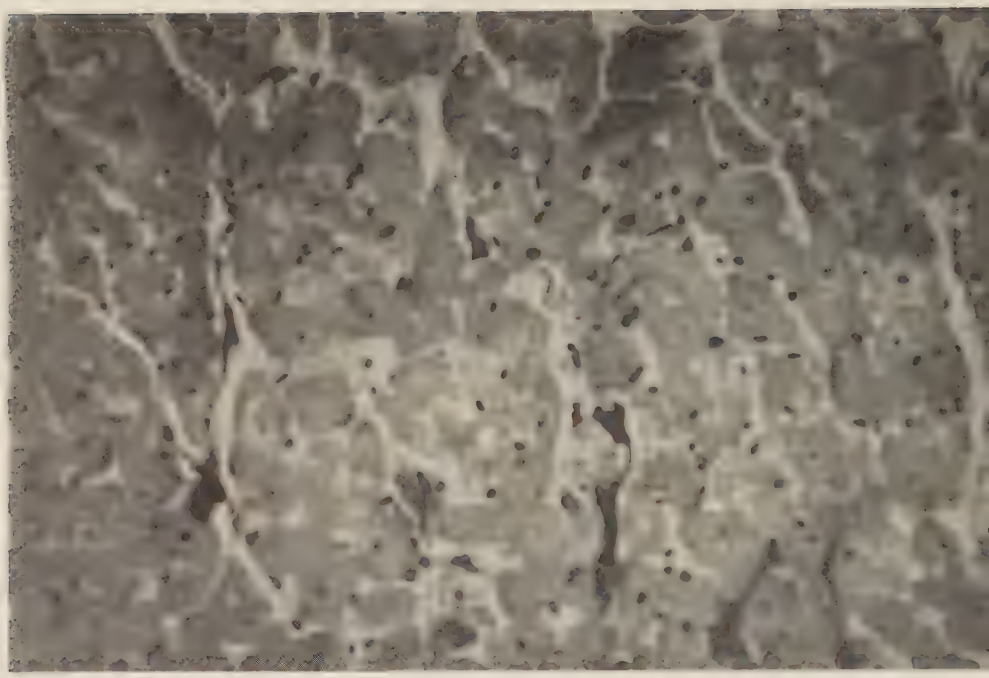


Abbildung 30:
Interstitielle Fibrose im Myokard nach Immunisierung mit Herzhomogenat (Van-Gieson)

Histologische Untersuchungen

	Myokard		Skeletmuskel		
Antigen zur Immunisation	Infiltrat	Nekrose	Infiltrat	Nekrose	ragged red. fibers
Myokardhomogenat (n=3)	++	+/++	(+)/++	(+)/++	(+)
Sarkolemm (n=2)	ø	ø	ø/+	ø/+	ø/(+)
Perikard (n=2)	ø	ø	ø	ø	ø
Myosin (Herz) (n=3)	+++	+++	ø	ø	ø/+
Myosin (Skeletmuskel) (n=3)	ø	ø	+	+	ø/+
Freund'sches Adjuvans (n=6)	ø	ø	ø	ø	ø

Tabelle 4:
Histologische Veränderungen nach Immunisierung mit kardialen Antigenen

3.7.2 Immunhistologische Untersuchungen

Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten, daß sich die zirkulierenden Antikörper schon intravital an autologes Myokard gebunden hatten. Das Fluoreszenzmuster der Antikörper entsprach dem der indirekten Immunfluoreszenz (=Serumantikörper). Die antisarkolemmale Fluoreszenz war im Vergleich zu den intrazellulären Fluoreszenzen im allgemeinen stärker ausgeprägt. Abbildung 31 zeigt die Bindung antisarkolemmaler Antikörper an autologes Myokard sowie subendotheliale Fluoreszenzdepots. Bei ihnen dürfte es sich wahrscheinlich um abgelagerte Immunkomplexe handeln.

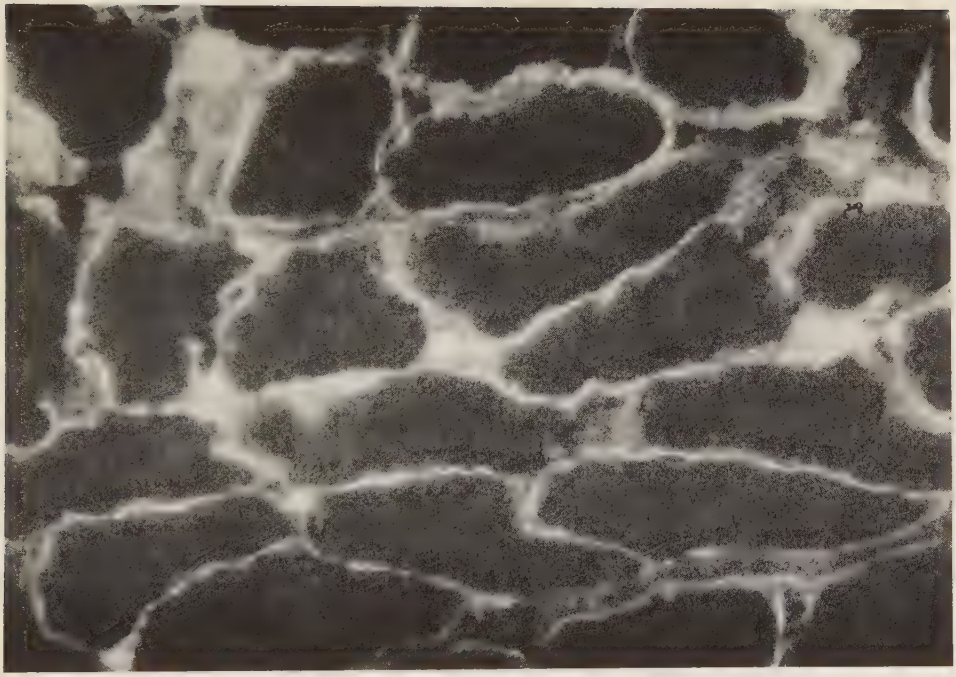


Abbildung 31:
Antisarkolemmale Antikörper im indirekten Immunfluoreszenztest. Gleichzeitig lassen sich subendotheliale Depots zeigen, bei denen es sich wahrscheinlich um abgelagerte Immunkomplexe handelt.

4. DISKUSSION

Immunologische Effektormechanismen spielen vermutlich in der Pathogenese einer Reihe perimyokardialer Erkrankungen eine wesentliche Rolle. Beim Postmyokardinfarktsyndrom (Kuch 1973; Maisch et al., 1977; 1979), beim Postperikardiotomiesyndrom (Engle et al., 1974, 1980; Maisch et al., 1979), beim Rheumatischen Fieber (Ghose and Mammen, 1977; Zabriskie et al., 1970) und bei der Virusmyokarditis (Dragatakis et al., 1979; Maisch et al., 1980) sowie bei den Kardiomyopathien (Fowles et al., 1979; Maisch et al., 1980) konnte der Nachweis geführt werden, daß humorale und zelluläre Immunreaktionen in zeitlicher Übereinstimmung mit dem zumeist exsudativen Erscheinungsbild der Erkrankung auftreten. Es lag deshalb nahe, in einem tierexperimentellen Modell durch Immunisierung mit kardialen Proteinen zu versuchen, eine autoimmune perimyokardiale Reaktion zu induzieren. Einige Untersucher benützen die Immunisierung von Versuchstieren mit homologen und heterologen Herzmuskelproteinen als Modell einer Myokarditis (Asherson und Dumonde, 1963; Bidoggia et al, 1972; 1974; Chaturvedi und Mehrotra, 1967; Halbert et al., 1968; 1971; 1973; Kaplan, 1958; 1963; Laufer, 1969; 1972; 1973; Thompson und Halbert, 1971; Tomioka, 1970; Waldmann et al, 1974). Sie konnten bei simultaner Injektion von Freundschem Adjuvans, das auch in den vorliegenden Untersuchungen Anwendung fand, oder bei gleichzeitiger Injektion abgetöteter hämolytischer Streptokokken nekrotisierende und entzündliche Veränderungen am Myokard der Versuchstiere lichtmikroskopisch und elektronenoptisch feststellen.

4.1 Antikörpervermittelte Immunreaktion

Seit Cavelti (1947) gilt die Hypothese, daß eine Immunantwort über Neoantigene induziert wird. Diese Vorstellung erfuhr eine Einschränkung dadurch, daß die Injektion homologen Gewebes ohne potenzierenden Effekt von Freundschem Adjuvans oder abgetöteten Streptokokken nur eine schwache humorale Immunantwort hervorruft und keine oder nur wenig Änderungen am autologen Myokard zeigt (Davies et al 1964; Cavelti, 1947). Eine Korrelation zwischen dem Nachweis antimyokardialer Antikörper und histologischen Veränderungen konnten beide Untersucher nicht zeigen. Auch in den vorliegenden Untersuchungen ist eine Korrelation zwischen den Titern zirkulierender antisarkolemmaler Antikörper und den histolgischen Kriterien einer Nekrose oder mononukleären Zellinfiltrationen nicht eindeutig nachzuweisen. So waren z.B. zwar hochtitrige antisarkolemmale Antikörper nach Immunisierung mit Perikard vorhanden, histologische Veränderungen aber fehlten. Andererseits ging bei der Immunisierung mit Herzmuskelextrakt die Vielzahl von Autoantikörpern auch mit entsprechenden histologischen Veränderungen am autologen Myokard einher, wobei die unterschiedliche Immunisierungsdauer sicher ebenfalls von Bedeutung ist. Uneinheitlich ist auch die Interpretation von induzierter Perimyokarditis und humoralen Effektormechanismen in der Literatur: So fand Davis et al (1964), Fukuta et al (1980) und Kaplan and Craig (1963) keine Korrelation zwischen Antikörpertiter und Myokarditis. Auch bei anderen tierexperimentellen Modellen von Autoimmunerkrankungen, so der autoimmunen Enzephalo-Myelitis, der autoimmunen Thyreoiditis und der autoimmunen Orchitis konnte gezeigt werden, daß die Entzündungsreaktion keine feste Beziehung zum Antikörpertiter aufwies (Bier et al, 1979, S. 253 - 269).

Auch Transferexperimente der Antikörper von erkrankten auf gesunde Tiere waren meist nicht erfolgreich. Lediglich Tomioka (1970) gelang es, eine autoimmune Myokarditis mit Hilfe des Serums immunisierter Tiere zu übertragen, nachdem er die Versuchstiere durch Hyperimmunisierung mit Immunglobulinen zur Schädigung der Blutgefäßbarriere vorbehandelt hatte. Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf unterschiedliche Nachweismethoden für Autoantikörper (Immundiffusion, indirekter Immunfluoreszenztest, Hämagglutinationsreaktion mit tannierten Erythrozyten, Komplementbindungsreaktion) zurückgeführt werden, da der Nachweis allein zunächst nichts über die pathogenetische Rolle der Antikörper aussagen. So dürfte, wie am Beispiel der Autoimmunglomerulonephritis von Lerner und Dixon (1966) und bei der autoimmunen Thyreoiditis von Nakamura und Weigle (1969) gezeigt wurde, nicht jeder Antikörper eine zytolytische Funktion besitzen. Auch Davies (1965) konnte zeigen, daß bei der autoimmunen Myokarditis der Ratte die Bestimmung des Antikörpertiters von der verwendeten Nachweismethode abhängt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein breites Spektrum von Methoden zur Untersuchung des humoralen Effektorsystems verwandt: Mit dem indirekten Immunfluoreszenztest konnten zirkulierende Antikörper nachgewiesen werden, in der Komplementbindungsreaktion wurde geprüft, ob ein Komlementverbrauch vorliegt, im Agar-Immundiffusionstest ihre präzipitierenden Eigenschaften untersucht. Von entscheidender Bedeutung für das pathogenetische Verständnis humoraler Effektormechanismen bei experimenteller Myokarditis ist der Nachweis solcher antimyolemmaler Antikörper, die in vitro unter Zugabe von Komplement vitale Herzmuskelzellen lysieren. Dieses pathogenetische Prinzip konnte bereits bei der virusindizierten Myokarditis (Maisch et

al., 1981, 1982) als wahrscheinliche Ursache einer sekundären Immunpathogenese bei Perimyokarditiden nachgewiesen werden.

Für die einzelnen Nachweismethoden zirkulierender Autoantikörper sind Spezifität und Sensitivität der Testuntersuchungen besonders zu berücksichtigen. Die Hypothese, daß spezifische Antikörper gegen kardiale Antigene gebildet werden, trifft nur dann zu, wenn heterophile Antikörper (Hawkins et al, 1977), Isoantikörper gegen Blutgruppensubstanzen (Duheille und Petitier, 1967) und organunspezifische Antikörper gegen Kollagen ausgeschlossen werden. Die heterophilen Antikörper wurden anhand ihres charakteristischen, von Hawkins et al (1977) beschriebenen Immunfluoreszenzmusters ausgeschlossen.

Eine myokardspezifische antimyolemmale Fluoreszenz wurde durch die Kollagenasevorbehandlung von Herzmuskelzellen erzielt, da die Kollagenase bindegewebliche Bestandteile der Basalmembran entfernt. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen (Maisch et al, 1981, 1982) konnte gezeigt werden, daß die antimyolemmale Fluoreszenz nicht durch eine unspezifische Bindung von Antikörpern über das Fc-Fragment an das Myolemm entsteht. Ebenso konnte eine unspezifische Bindung von Immunkomplexen an die Membran von Kardiozyten durch Verwendung von Immunkomplexen aus aggregiertem IgG in einem Kontrollversuch ausgeschlossen werden (unveröffentlicht). Andererseits weist die Tatsache, daß es bei der Immunisierung mit myokardialen Antigenen und Freundschem Adjuvans oder Kochsalzlösung und Freundschem Adjuvans zur Bildung antiendothelialer Bindegewebsantikörper kommt, darauf hin, daß eine unspezifische Induktion anderer Antikörper-

systeme gleichzeitig erfolgt. Wurde Freundsches Adjuvans weggelassen und lediglich mit Saline immunisiert, blieb eine solche Begleitreaktion aus. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten hingegen, daß antisarkolemmale, antifibrilläre und antiinterfibrilläre Antikörper nicht nur im Serum zirkulieren, sondern auch an das autologe Myokard gebunden sind, so daß diese Antikörper nicht nur die Funktion eines "Innocent-Bystanders" haben dürften. Neben einer diagnostischen kommt ihnen wahrscheinlich auch eine pathogenetische Bedeutung zu.

Es ist anzunehmen, daß die myokard- und muskelspezifischen Antikörper eine Mikroheterogenität von Antikörpern darstellen. So dürften antisarkolemmale Antikörper ebenso eine heterogene Gruppe sein, wie antifibrilläre Antikörper oder die Antimyosin-Antikörper. Dies belegen die z.T. unterschiedlichen Ergebnisse im indirekten Immunfluoreszenztest, der Immundiffusion und der Komplementbindungsreaktion. Es ist deshalb verständlich, daß z.B. nach der Immunisierung mit Herzmyosin Antikörper gegen das Myosin des Herzmuskels und der Fibrillen des Skelettmuskels gefunden wurden, während in der Immundiffusion keine Reaktion der Antimyosinseren mit Skelettmuskelmyosin nachweisbar war. In diesen Fällen ist anzunehmen, daß unterschiedliche Testsysteme auch unterschiedliche Funktionen einzelner Antikörper erfassen und Kreuzreaktionen im Immunfluoreszenztest nicht notwendigerweise auch solche in der Immundiffusion und in der Komplementbindungsreaktion bedingen.

Faßt man die Ergebnisse des indirekten und direkten Immunfluoreszenztests zusammen, dann gilt, daß neben einer unspezifischen Boosterung von Bindegewebsantikörper

vor allem jene Antikörper im Serum zirkulierten, die gegen das Antigen, mit dem immunisiert wurde, gerichtet waren. Die Titer dieser antimuskulären Antikörper waren jeweils am höchsten. Darüber hinaus konnte am Beispiel der Antikörper gegen Herzhomogenat und Herzmyosin gezeigt werden, daß diese sich auch an autologes Myokard in situ gebunden hatten.

Die zunächst erstaunliche Beobachtung, daß bei der Immunisierung mit Herz- und Skelettmuskelmyosin neben antifibrillären Antikörpern auch antisarkolemmale bzw. antimyolemmale Antikörper induziert wurden, läßt sich als Begleitreaktion im Rahmen einer Myokarditis bzw. einer Myositis interpretieren: geht man davon aus, daß bei der Immunisierung mit Myosin initial eine zelluläre Reaktion gegen Muskelantigene hervorgerufen wird, dann könnte es im Verlauf einer initial zellulären Myokarditis zur Alteration sarkolemmaler Determinanten kommen, die dann als Neoantigene erkannt werden und eine sekundäre Immunreaktion auch gegen Sarkolemm bewirken (Davies und Gery, 1960; Kaplan, 1969). Denkbar ist auch, daß es bei der subkutanen Injektion von Freundschem Adjuvans und Myosin auch zu einer Läsion von Muskelgewebe kam, das dem subkutanen Fettgewebe benachbart lag und so eine Reaktion des Immunsystems gegen Membranen erzeugt wurde.

Eine histologisch nachweisbare Fixierung von Antikörpern gegen intrazelluläre Haptene und Epitope im indirekten Immunfluoreszenztest setzt die Permeabilität der Membran voraus. Es muß deshalb postuliert werden, daß die sarkolemmale Membran einiger Herzzellen durch humorale oder zelluläre Effektormechanismen bereits permeabel geworden war, bevor

es zur intrazellulären Fixierung von Antimyosin-Antikörpern am autologen Myokard in situ kam. Zumindest in vitro konnte an vitalen Rattenkardiozyten gezeigt werden, daß die Membran vitaler Herzmuskelzellen intrazelluläre Antikörper nicht permeieren läßt.

Der Immundiffusionstest erfaßt vor allem IgG- und IgM-Antikörper, die zusammen knapp 90 % der normalerweise im Serum vorhandenen Antikörper ausmachen. Bei der Verwendung von Antimyosinseren und Myosin als Antigen konnten drei Banden gefunden werde. Dagegen fanden Perry (1967) und Bruggman (1975) nur eine Bande, wie zu erwarten wäre, wenn reines Antigen gegen Antiserum getestet wird. Obgleich auch in dieser Arbeit mit gereinigtem Myosin gearbeitet wurde, konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Ebenfalls mehr als eine Bande in der Immundiffusion fanden auch Furminger (1964), Horvàt und Strafiq (1969) sowie Lowey und Steiner (1972). Eine plausible Erklärung hierfür stellt die Struktur des nativen Myosins dar (vgl. 3.1.1, Abbildung 7). So fanden Horvàth und Gaetjens (1971), daß die leichten Ketten des Myosins im Agar unabhängig vom Myosinmolekül diffundieren können, Wikman-Coffelt et al (1973) identifizierten bei Verwendung von gereinigten schweren Ketten eine und bei der Verwendung von gereinigten leichte Ketten zwei Bande, womit sich die hier gefundenen drei Banden unschwer als Präzipitationslinien der schweren Kette und der beiden leichten Ketten des Myosins identifizieren lassen.

Die Beobachtung, daß in den Seren der mit Myosin immunisierten Tiere auch Linien der Identität mit antiperikardalen Antikörpern auftraten, muß entweder als Zeichen

einer Verunreinigung der Myosinpräparationen, z.B. dem von Starr und Offer (1971) beschriebenen F-Protein (vgl. 4.4) oder als Folge der Immunisierung unter Zugabe von Freundschem Adjuvans interpretiert werden. Hierzu können auch die Befunde von Furminger (1964) herangezogen werden: Das verunreinigende Protein könnte so stark immunogen sein, daß geringe Mengen in der Antigenpräparation im Verlauf der Immunisierung zur Antikörperbildung führen. Andererseits ist ihre Konzentration in der Antigenlösung so gering, daß beim Immundiffusionstest keine Bande sichtbar wird. Es ist dann anzunehmen, daß das verunreinigende Protein in der Perikardpräparation in höheren Konzentrationen vorlag.

Nach Immunisierung mit heterologem Herzmuskelhomogenat konnten sechs verschiedene präzipitierende Antikörper identifiziert werden, von denen drei mit den Banden des Myosins Identitätslinien zeigten. Der Nachweis von drei Präzipitationslinien gegen Myosin bei Immunisierung mit Herzmuskelhomogenat entspricht der von Hassalbach und Kramer (1975) vertretenen Hypothese, daß etwa 40 % der kardialen Proteine der Rohhomogenats Myosin sein dürften. Auch Halbert (1968) konnte nach Immunisierung mit Herzmuskelextrakt sechs Präzipitationslinien finden, so daß diese Untersuchungen seine Befunde bestätigten.

Nach Immunisierung mit Skelettmuskelmyosin ließ sich im Immundiffusionstest im Gegensatz zur indirekten Immunfluoreszenz kein präzipitierender Antikörper nachweisen. Es ist daher anzunehmen, daß die im indirekten Immunfluoreszenztest identifizierten Antikörper größtenteils nicht präzipitierend waren. Die relativ geringe Immunantwort auf die Immunisierung mit

gereinigtem Kaninchen-Skelettmuskelmyosin im Vergleich zur Behandlung mit gereinigtem Rinder-Herzmyosin muß darauf zurückgeführt werden, daß beim 1. Ansatz homologes und beim 2. Ansatz heterologes Antigen verwendet wurde.

4.2 Nachweis von Antikörpern gegen kardiales Myosin

Besondere Sorgfalt wurde auf die Isolierung und Immunisierung mit kardialem Myosin verwandt. Das Myosin ist ein kompliziertes Makromolekül mit einem Molekulargewicht von ca. 500 000 D. Physikochemisch stellt es sowohl ein fibrilläres Strukturprotein, als auch ein globuläres Enzym dar (vgl. Abbildung 7). Es besteht aus zwei schweren Ketten, die immunologisch identisch sind (Wikman-Coffelt et al, 1973) und vier leichten Ketten, von denen je zwei immunologische Identität zeigen (Wikman-Coffelt et al 1973). Durch Trypsinisierung ist es in zwei Fragmente zu spalten, das Light Meromyosin und das Heavy Meromysin, wobei dem Heavy Meromysin die enzymatische ATPase-Aktivität des Myosins und die Aktinbindungsfähigkeit erhalten bleiben. Nach Behandlung mit 2 molarer Guanin-HCl-Lösung lassen sich vom Myosin die leichten Ketten reversibel dissoziieren (Horvàth und Gaetjens, 1971; Schwartz et al, 1978; 1977). In Anlehnung an Furminger (1963), Lowey und Steiner (1972) und Gröschel-Stewart (1971) wurde zur Immunisierung intaktes Myosin verwendet, da die leichten Ketten alleine aufgrund ihres kleinen Molekulargewichts eine geringere Immunogenität zeigen als das Gesamtmolekül oder die schwere Kette. Um Verfälschungen in der Antikörpersynthese durch die Denaturierung des isolierten Proteins zu vermeiden, wurde das Myosin in Glyzerin bei -20°C gelagert, in dem die Denaturierungsprozesse nur gering sind (Schwartz et al, 1977).

Zwar wird allgemein eine absolute Tierklassenspezifität der Myosine der Herz- und Skelettmuskeltypen angenommen (Schwartz et al 1977; Bruggman und Jenny, 1975), jedoch bestehen uneinheitliche Auffassungen über die Spezifität der Myosine einzelner Muskeltypen pro Spezies. Während Gröschel-Stewart (1971) und Schwartz et al (1977) eine immunologische Spezifität der einzelnen Myosine fanden, haben Bruggman und Jenny (1975) und Schwartz et al (1978) geringe Kreuzreaktionen zwischen Herz- und Skelettmyosin gefunden. Da in diesen Untersuchungen keine Kreuzreaktionen zwischen Skelettmuskelmyosin von Kaninchen und myokardialem Myosin von Rindern im Immundiffusionstest nachgewiesen wurde, unterstützt dies die immunologische Spezifität myokardialen Myosins. Schwartz et al (1978) fanden kreuzreagierende Antikörper allerdings nur dann, wenn sie Herz- und Skelettmuskelmyosin derselben Spezies (Kaninchen oder Ratte) verwandten. Auch hier konnten Kreuzreaktionen im indirekten Immunfluoreszenztest nur sehr schwach und in der Immundiffusion nicht nachgewiesen werden, während Kreuzreaktionen zwischen Rinder-, Kaninchen-und Rattenmyokard eindeutig waren. Darüberhinaus bestätigt die Beobachtung, daß nach Immunisierung mit Herzmyosin nur eine myokardiale Reaktion, nach Immunisierung mit Skelettmuskelmyosin nur eine Myositis histologisch nachweisbar war, die Spezifität kardialen Myosins zumindest bezüglich des zellulären Effektormechanismus.

Die hier verwendete Myosinpräparation war weitgehend rein, abgesehen von einer bereits bei Bruggman und Jenny (1975) und Khaw et al (1976) beschriebenen geringen Verunreinigungsbande, die Tropomyosin sein könnte, die Khaw aber für Aktin hält. Die dritte Möglichkeit ist, wie von Bruggman und Jenny (1975) angenommen und von Starr und Offer (1971) beschrieben, daß es sich um das F-Protein handelt.

Mit Hilfe des Myosins als weitgehend gereinigtes myokardspezifisches Antigen wurde ein Test zum Nachweis von Antimyosin-Antikörpern im Serum entwickelt. Ziel des Solid-Phase-Fluorometric-Assay (SPFA) war es, auf einfache Weise Antimyosin-Antikörper quantitativ zu messen und so Verlaufsbeobachtungen bei den Versuchstieren, später übertragbar auf Patienten mit entzündlichen Herzerkrankungen, zu ermöglichen.

Mit Hilfe bisheriger Tests war es nicht möglich, eine unkomplizierte quantitative Messung von Antimyosin-Antikörpern ohne Verwendung radioaktiv markierter Substanzen durchzuführen. Zoborovsy et al (1978) führten Untersuchungen mit dem indirekten Immunfluoreszenztest, Lomprè et al (1979) mit der Komplementbindungsreaktion, Furminger (1964) mit dem Immundiffusionstest, Khaw et al (1980) mit dem Radioimmunoassay durch. Im hier dargestellten experimentellen Modell einer autoimmunen tierexperiemtellen Myokarditis konnten die ersten drei Untersuchungsmethoden miteinander verglichen und gezeigt werden, daß der SPFA tatsächlich eine quantitative Messung in allen Fällen gestattet. In der Komplementbindungsreaktion war dagegen eine quantitative Messung der spezifischen Antimyosin-Antikörper bei antikomplementären Seren nicht möglich. In der indirekten Immunfluoreszenz ließ sich die Titerhöhe ohne Ausverdünnung nur semiquantitativ abschätzen. In der Immundiffusion war mit einem vertretbaren Aufwand nur der qualitative Nachweis der Antikörper zu führen. Dagegen zeichnet sich der SPFA durch eine hohe Spezifität und Sensitivität aus.

Die Sensitivität der Komplementbindungsreaktion ist deshalb eingeschränkt, weil nur komplementbindene Antikörper erfaßt werden. Diese Einschränkung ist bedeutsam, da sich

das Antikörperspektrum im Laufe der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Antigen verändert (Davies, 1965; Prager und Wilson, 1971). Außerdem treten bei hohen Serumkonzentrationen unspezifische Agglutinationen zum Teil bis zu Titern von 1:8 auf, die die Auswertung erschweren. Die Spezifität der KBR ist durch falsch positive Ergebnisse verringert, die auf den erwähnten antikomplementären Eigenschaften einiger Seren bis zu Titern von 1:256 beruhen. Bezüglich der Sensitivität des Immundiffusionstests gilt entsprechendes wie bei der Komplementbindungsreaktion, da nur präzipitierende Antikörper erfaßt werden. Bezüglich der Spezifität sind Immundiffusion und Solid-Phase-Fluorometric-Assay vergleichbar, da bei beiden reines Myosin als Antigen verwendet werden kann.

Die Sensitivität des indirekten Immunfluoreszenztests wird durch die Schwierigkeit eingeschränkt, daß die antifibrilläre Fluoreszenz sich bei niederen Titern nicht sicher dem Myosin oder dem Aktin zuordnen läßt. Dieser Umstand schließt falsch positive oder falsch negative Ergebnisse ein.

Die virtuellen FSU-Einheiten wurden mit Titerverdünnungen des indirekten Immunfluoreszenztests verglichen, da andere Nachweismethoden wie die KBR ein unterschiedliches Antikörperspektrum messen können: So ist aus Untersuchungen von Davies (1965) bei autoimmunen Myokarditiden der Ratte erwähnenswert, daß während der Immunisierung mit Herzhomogenat zunächst komplementbindende, erst später hämagglutinierende und präzipitierende Antikörper auftreten. KBR und SPFA korrelieren deshalb nicht in allen Stadien der autoimmunen Myokarditis gleich gut. Dies bestätigen auch diese Untersuchungen, bei denen die komplementbindenen Antikörper zu Beginn der Immunisierung im Vergleich zu den SPFA-Titern höher liegen als am Ende (vgl.

Abbildung 13). Diese Überlegungen fallen beim Vergleich der indirekten Immunfluoreszenz mit dem SPFA, die beide auf demselben Prinzip beruhen, nicht ins Gewicht. Damit konnte mit Hilfe des SPFA für Myosin eine sensitive, spezifische und quantitative Methode zum Nachweis von Antimyosin-Antikörpern entwickelt werden, die auch für klinische Belange (Maisch et al, 1980; 1981) Bedeutung besitzen dürfte.

4.3 Pathogenetische Bedeutung antimyokardialer Antikörper

Da Antikörper, die gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind, an vitale Zellen nicht gebunden werden, dürfte ihnen eine vorwiegend diagnostische Bedeutung zukommen. Die indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen haben gezeigt, daß sich nur antimyolemmale Antikörper an die Membran vitaler Herzmuskelzellen fixieren. Im Kardiozytolysetest konnte darüberhinaus nachgewiesen werden, daß hochtitrige antimyolemmale Antikörper in der Gegenwart von Komplement eine Lyse vitaler Herzmuskelzellen induzieren. Auch bei vorsichtiger Interpretation und Übertragung von in vitro-Ergebnissen auf Bedingungen in vivo, liegt es nahe anzunehmen, daß das pathogenetische Prinzip der humoralen sekundären Immunpathogenese der autoimmunen Perimyokarditis im Tierversuch komplementbindende zytolytische antimyolemmale Antikörper sind. Inwieweit zusätzlich unspezifische zytotoxische Serumfaktoren (Bengmark et al, 1963; Sachov et al, 1979) eine Rolle spielen, läßt sich nicht eindeutig abschätzen. Für eine antikörperabhängige Zytolyse spricht aber, daß sich die Zytolyse nur in Gegenwart von Antikörpern und Komplement nachweisen ließ. Wurden Kardiozyten mit dekomplementiertem Serum alleine inkubiert, fand keine zytolytische Reaktion statt (Maisch et al, 1982).

Die bei diesen Versuchen verwendeten Zielzellen, die durch Kollagenase isolierte Rattenkardiozyten, hatten ihre antigenen myolemmalen Determinanten nicht verloren. Dagegen lassen sich bei den mit Trypsin isolierten Myozyten nicht mehr alle antigenen Determinanten nachweisen (Masson und Pevet, 1978; Schwarzfeld und Jacobson, 1979), ebenso wie bei foetalen Myokardzellen (Gibofski et al, 1975), die von einigen Untersuchern (Friedman und Laufer, 1976; Ghose und Mammen, 1977; Thompson und Halbert, 1971) verwendet wurden. Unterschiede in der Antigenstruktur der Zielzellen sind die naheliegendste Erklärung dafür, daß diese Untersucher keine eindeutige zytolytische Serumaktivität ASA-positiver Seren gegenüber Herzmuskelzellen in Kultur nachweisen konnten.

Die Spezifität der zytolytischen Reaktion durch AMLA-positive Seren wurde durch die fehlende Zytolyse bei der Verwendung von Zielzellen anderer Gewebe, z.B. Hepatozyten, bestätigt.

Daß zytolytische Antikörper nicht das einzige pathogenetische Prinzip darstellen dürften, wird aus Untersuchungen zur Virusmyokarditis im murinen System deutlich (Woodruff und Woodruff, 1977; Woodruff und Woodruff, 1974; Wong et al, 1977; Huber et al, 1980). Auch in den hier beschriebenen Untersuchungen zeigte sich, daß bei den mit Myosin immunisierten Tieren eine zytolytische Aktivität im Serum nur bei einem Versuchstier nachweisbar war, während alle vier Versuchstiere histologisch Zeichen einer Myokarditis aufwiesen. Damit läßt sich indirekt zeigen, daß zelluläre Effektormechanismen eine mindestens ebenbürtige Rolle in der Pathogenese der Autoimmunmyokarditis spielen dürften und wahrscheinlich besonders in der Frühphase der Perimyokarditis wirksam werden.

4.4 Zelluläre Immunreaktion

Von anderen autoimmunen Erkrankungen, so der autoimmunen Adrenalitis (Levine und Wenk, 1968), der allergischen Enzephalomyelitis (Levine et al, 1967; Smith und Waksman, 1969) und der autoimmunen Thyreoiditis (Jankovic et al, 1969) ist bekannt, daß sich autoimmune Reaktionen zwar nicht regelmäßig durch Serum, wohl aber durch sensibilisierte Lymphozyten auf syngene Tiere übertragen lassen. Auch bei der experimentellen autoimmunen Myokarditis finden sich zahlreiche Hinweise dafür, daß sensibilisierte Lymphozyten in der Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen (Bidoggia et al, 1971; Chaturvedi und Mehrotra, 1967; Friedman et al, 1971; Huber et al, 1980; Woodruff und Woodruff, 1974; Woodruff und Woodruff, 1977). Zur allgemeinen Einschätzung des zellulären Immunsystems der Versuchstiere wurde deshalb eine Stimulation der Lymphozyten mit Phytohämagglutinin unternommen (vgl. hierzu Oppenheim et al, 1970; Penhale et al, 1974; Roitt, 1977). Sie ergab Hinweise auf eine verminderte zelluläre Immunreaktivität. Auf eine spezifische Sensibilisierung zellulärer Effektorsysteme deuten die positiven Ergebnisse der Intradermalteste hin. Ebenso konnte durch eine Stimulation der Lymphozyten der Versuchstiere gegen die zur Immunisierung verwendeten Antigene in vitro gezeigt werden, daß es möglich ist, Subpopulationen sensibilisierter Lymphozyten zu stimulieren. Eine Differenzierung in B- und T-Effektorlymphozyten war aufgrund des Testsystems nicht möglich. In gleicher Weise lieferten die histologischen Untersuchungen Hinweise auf in vivo abgelaufene zelluläre Reaktionen durch den Nachweis mononukleärer Zellinfiltrate im Myokard oder der Skelettmuskulatur um nekrotische Bezirke.

Bei der Abschätzung der zellulären Immunantwort ergab sich eine nachweisbare Suppression der Antwort auf Phytohämagglutinin bei den mit Herzmuskelhomogenat und kardialem Myosin immunisierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Suppression konnte nicht auf einen im Serum nachweisbaren Faktor zurückgeführt werden, da diesbezügliche Untersuchungen negativ verliefen. Diese allgemeine Suppression zellulärer Effektororgane läßt sich am ehesten im Rahmen eines regulativen Vorgangs auf die überschießende, gegen den Wirt gerichtete spezifische zelluläre Reaktion werten. Alle Tiere mit einer supprimierten PHA-Stimulation hatten auch histologisch eine eindeutige autoimmune Myokarditis. Eine Suppression zellulärer Effektorsysteme ist z.B. bei der experimentellen Zytomegalievirusinfektion bei Mäusen (Selgrade et al, 1976) und ebenso bei einigen autoimmunen und viralen Erkrankungen des Menschen beschrieben (Agarwal et al, 1971; Gatti et al, 1970; Newble et al, 1975; Oppenheim et al, 1970; Thestrup-Petersen et al, 1976).

Im Gegensatz zur allgemeinen Hyporeagibilität des gesamten zellulären Immunsystems fand sich bei den Versuchstieren eine spezifische Hyperreagibilität des zellulären Systems auf die zur Immunisierung verwendeten Antigene im Intradermaltest und bei der spezifischen Stimulation. Allerdings gelang in vitro der Nachweis spezifischer zellulärer Reaktionen nur bei den Lymphozyten der mit Herzmyosin nicht jedoch bei den mit Herzhomogenat immunisierten Tiere. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist, daß die Konzentration der entsprechenden antigenen Determinanten in der Kultur nicht hoch genug war, um eine spezifische Proliferation der Lymphozyten anzuregen. Bei höheren Antigenproteinkonzentrationen

überlagern sich jedoch unspezifisch suppressorische, den stimulatorischen Effekten in den Kulturen, wie sie schon von Testrup-Peterson et al (1976) und von Benezra et al (1967) gefunden wurden.

Da es trotz mehrfacher Versuche nicht gelang, vitale autologe Kardiozyten als Zielzellen zu isolieren, mußte die zytotoxische Reaktion auf heterologe Zielzellen (adulte Rattenkardiozyten) beschränkt werden. Es dürfte sich deshalb im vorliegenden Testsystem nicht um zytolytische T-Lymphozyten handeln, da zur Ausprägung solcher Reaktionen neben den antigenen Determinanten die autologen HLA- oder MHC-Determinanten erkannt werden müssen (Zinkernagel und Doherti, 1976). Mit dem vorliegenden in vitro Testsystem konnten deshalb lediglich K-lymphozytäre und NK-lymphozytäre Aktivitäten (Akira und Tagasugi, 1977; MacLennan, 1972; Pearson, 1978; Perlmann et al, 1972) in der Spätphase der autoimmunen Myokarditis ausgeschlossen werden. Bezüglich der antikörperabhängigen zytotoxischen Reaktion ist anzunehmen, daß sie durch Immunkomplexe, wie von MacLennan (1972) und Kiuchi und Takasugi (1976) gezeigt, inhibiert wird. In den hier verwendeten Seren waren Immunkomplexe häufig nachweisbar.

Zusammenfassend sind Untersuchungen zu zellulären Immunreaktionen noch fragmentarisch: Bei Immunisierung mit kardialen Antigenen kommt es zunächst zu einer spezifischen Hyperreaktion des zellulären Immunsystems gegenüber diesen Antigenen. Bei den Untersuchungen hier konnten direkte zytotoxische K-Zell-bzw. NK-Zell-Aktivitäten nicht gezeigt werden. Aus Untersuchungen im murinen System ist jedoch zu

schließen, daß zytotoxische T-Zellen, die sowohl die HLA-, als auch die Antigen-Determinanten erkennen, eine wesentliche Rolle in der Immunpathogenese der tierexperimentellen Myokarditis spielen. Im hier vorgestellten Untersuchungssystem konnte dies durch die positiven Intradermaltests und die antigenspezifische Stimulation sensibilisierter Lymphozyten approximiert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Untersuchungen zur tierexperimentellen Perimyokarditis in Kaninchen war es zu prüfen, welche Antikörper bei der Immunisierung gegen Herzmuskelhomogenat, lösliche Myokardproteine (Sarkolemmanreicherung), Perikardextrakt sowie Herz- und Skelettmuskelmyosin erzeugt werden, ob sie eine pathogenetische Rolle spielen und ob durch die Immunisierung mit definierten Myokardproteinen zellvermittelte Immunreaktionen induziert werden.

Antimyolemmale (AMLA) bzw. antisarkolemmale (ASA), antifibrilläre (AFA) und antiinterfibrilläre (IFA) Antikörper in hohen Titern konnten im Serum der immunisierten Versuchstiere und gebunden an autologes Myokard nachgewiesen werden. Immunisierungen mit Herzmuskelhomogenat und löslichen Myokardproteinen induzierten die Synthese von ASA, AFA und IFA, die Immunisierung mit Perikardextrakt die Bildung von ASA und die Immunisierung mit Myosin die Bildung antifibrillärer Antikörper vom Antimyosin-Typ. Nur antimyolemmale Antikörper in hohen Titern induzierten eine Zytolyse vitaler Kardiozyten, so daß ihnen bei der tierexperimentellen Myokarditis keine protektive, sondern eine zytotoxische Wirkung zugeschrieben werden muß.

Mit Hilfe eines neuentwickelten Solid-Phase-Fluorometric-Assay konnten die zuvor in der Komplementbindungsreaktion und im Immundiffusionstest nachgewiesenen Antimyosin-Antikörper auf einfache, reproduzierbare und spezifische Weise quantitativ gemessen werden. Dieser Test ist über das hier gezeigte tierexperimentelle Versuchssystem hinaus geeignet, auch einen quantitativen Nachweis von Antimyosin-Antikörpern bei Myokarditiden, Kardiomyopathien und Myositiden zu ermöglichen.

Positive Intradermalteste sowie eine dosisabhängige antigenspezifische Stimulation von Lymphozyten der Versuchstiere gegenüber dem zur Immunisierung verwendeten Antigen und die histologisch nachweisbaren mononukleären Zellinfiltrate zeigen, daß nicht nur antikörpervermittelte, sondern auch zellvermittelte Immunreaktionen an der Pathogenese der tierexperimentellen Perimyokarditis beteiligt sind. Dagegen konnten vor und am Ende der Immunisierung im Untersuchungssystem zytotoxische Reaktionen vom NK-Zell- bzw. K-Zell-Typ nicht nachgewiesen werden.

Es ließ sich deshalb zeigen, daß

1. antikörpervermittelte zytolytische Immunreaktionen in vitro vorliegen und möglicherweise in vivo wirksam sind, und daß
2. zellvermittelte Immunreaktionen eine gleichfalls bedeutsame Rolle in der Pathogenese der experimentellen Myokarditis spielen dürften.

Herrn Professor Dr. K. Kochsiek danke ich für seine Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas, Herrn Dr. med. habil. B. Maisch für die wissenschaftliche Betreuung, sein Verständnis und die Förderung bei der Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten, Herrn Prof. P.A. Berg, Universitätsklinik Tübingen für die stimulierenden Diskussionen und konstruktive Kritik.

Herrn Dr. Wiethölter danke ich für die sorgfältige histologische Bearbeitung der Myokard- und Skelettmuskel-Proben, Herrn E. Stechemesser für seine Mithilfe bei biochemischen Untersuchungen und Herrn Dr. Medugorac für die Durchführung der SDS-Elektrophoresen mit Myosinproben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Agarwal, SS; Blumberg, RS; Gerstby, BJS; London, WT; Milman, I; Sutnick, AI; Loeb, LA:
Lymphocyte transformation and hepatitis I. Impairment of Thymidine incorporation and DNA-polymerase activity
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 1498 - 1502, 1971

2. Akira, D; Takasugi, M:
Loss of specific natural cell-mediated cytotoxicity with absorption of natural antibodies from serum
Int. J. Cancer 19, 747 - 755, 1977

3. Asherson, GL; Dumonde, DC:
Autoantibody production in rabbits. II. Organ-specific autoantibody in rabbits injected with rat tissue
Immunology 6, 19 - 29, 1963

4. Basili, R; Koerner, E; Zuloaga, G; Laguens, R; Bidoggia, H:
Myocarditis homoallergica experimental (Experimantal homoallergic myocarditis)
Medicina (B. aires), 30, 255 - 260, 1972

5. Benezra, S; Gerry, I; Davies, MA:
Transformation of rabbit lymphocytes by specific antigens
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 1305 - 1308, 1967

6. Bengmark, S; Frisen, L; Helander, E:
A cytotoxic serum factor in heart disease
Acta allerg. 18, 479 - 483, 1963

7. Bidoggia, H; Koerner, E; Basili, R; Zuloaga, G; Laguens, R; Mercuri, de OC:
Myocardite hétéro-allergique expérimentale
Arch. Mol. du Coeur 65 (10), 1219 - 1225, 1972

8. Bidoggia, H; Koerner, E; Basili, R; Zuloaga, G; Laguens, R; Blakley, E:
Myocardite immunoallergique expérimentale pouvoir antigénique du sédiment de coeur macéré de cobayé
Arch. Anat. Path. 22 (2), 93 - 97, 1974

9. Bier, OG; Götze, D; Mota, I; Dias da Silva, W:
Experimentelle und klinische Immunologie
1. Auflage Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1979

10. Böyum, A:
Separation of leucocytes from blood and bone marrow
Scand. J. Clin. and Lab. Invest 21 (Suppl 97)

11. Bradford, MM:
A rapid and sensitive methode for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Analytical Biochemistry 72, 248 - 254, 1976

12. Brokman, 1937:
zitiert nach Duheille, J; Petitier, H; Faivre, G:
Aspect actuel de l'auto-immunité cardiaque
Cahier de medicine 8 (13), 1091 - 1098, 1967

13. Bruggman, S; Jenny, E:
The immunological specifity of myosin from cross striated muscles as revealed by quantitive microcomplement fixation and enzym inhibition by antisera
Biochim. Biophys. Acta 412, 39 - 50, 1975

14. Cavelti, PA:
Studies on pathogenesis of rheumatic fever. I. Experimental production of autoantibodies to heart, skeletal muscle and connective tissue
Arch. Pathol. 44, 1 - 12, 1947

15. Cavelti, PA:
Studies on the pathogenesis of rheumatic fever. II. Cardiac lesions produced in rats by means of autoantibodies to heart and connective tissue
Arch. Pathol. 44, 13 - 26, 1947

16. Chaturvedi, UC; Merotra, RML:
Effect of neonatal thymectomy an experimentally produced immunological cardiac lesions
Nature 216, 267 - 268, 1967

17. Chaturvedi, UC; Mehrotra, RML:
Experimentally produced immunologic cardiac lesions
Ind. J. Med. Res. 55 (1), 21 - 28, 1967

18. Coons, AH; Kaplan, MM:
Localization of antigens in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody
J. exp. Med. 91, 1 - 13, 1950

19. Cs'aky, L; Szab'o, J; Szegi, J:
Immunfluorescent studies in isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats
Experientia 30, 428 - 429, 1974

20. Davies, AM; Gery, I:
The role of autoantibodies in heart disease
Am. Heart J. 60 (5), 669 - 674, 1960

21. Davies, AM; Gery, I; Lazavor, E:
Organ specifity of the heart. II. Circulating antibodies and immunpathological lesions in experimental animals
Arch. Path. Lab. Med. 78, 369 - 376, 1964

22. Davies, AM; Gery, I; Lazavor, E:
Serological reactions of the rat to extracts of heterologous hearts
Isr. J. Med. Science 1, 315, 1965

23. Dragatakis, LN; Klassen, J; Hüttner, I; Fraser, DG; Poinier, NL; Klassen, GA:
Autoimmune myocarditis: A clinical entity
CMA-Journal 120, 317 - 321, 1979

24. Duheille, J; Petitier, H:
Etude immunohistologique des auto-antigènes myocardiques
Société de Biologie de Nancy, séance du 14 février 1967, 419 - 424, 1967

25. Duheille, J; Petitier, H; Faivre, G:
Aspect actuel de l'auto-immunité cardiaque (Current status of cardiac autoimmunity)
Cah. Coll. Med. Hop. Paris, 8, 1091 - 1098, 1967

26. Engle, MA; McCabe, JC; Ebert, PA; Zabriskie, J:
The post-pericardiotomie syndrome and antiheart antibodies
Circulation 49, 401 - 406, 1974

27. Engle, MA; Zabriskie, JB; Senterfit, LB; Gay, DJ; Ebert, PA:
Immunologic and virologic studies in the postpericardiotomy syndrome
J. Pediatr. 87, 1103 - 1108, 1975

28. Engle, MA; Zabriskie, JB; Senterfit, LB; Gay, WA; O'Loughlin, JE; Ehlers, HH:
Viral illness and the postpericardiotomy syndrome. - A prospective study in children
Circulation 62, 1151 - 1158, 1980

29. Fowels, RE; Bieber, CP; Stinson, EB:
Defective in vitro suppressor cell function in idiopathic congestive cardiomyopathy
Circulation 59, 483 - 491, 1979

30. Friedman, I; Ron, N; Laufer, A; Davies, MA:
Experimental myocarditis: Enhancement by the use of pertussis vaccine in lewis rats
Experientia 10., 1143 - 1145, 1970

31. Friedman, I; Laufer, A; Ron, M; Davies, AM:
Experimental myocarditis: In vitro and in vivo studies of lymphozcytes sentisized to heart extract and group A streptococci
Immunology 20, 225 - 232, 1971

32. Friedman, I; Laufer, A:
Electron microscopical studies of the effect of antiheart antibodies and complement on beating heart cells in culture
J. Mol. Cell. Cardiol. 8, 641 - 650, 1976

33. Fukuta, S; Iwamoto, S; Kimura, Y; Yamakawa, K; Wada, K; Kusukawa, R; Honda, M:
Experimental myocarditis. I. Cardiac lesions in rats induced by immunization with homologous heart extracts
Japan. Circ. J. 44, 833 - 837, 1980

34. Furminger, IGS:
The antigenic constituents of myosin preparations
Biochim. Biophys. Acta 194, 310 - 319, 1964

35. Gatti, RA; Garrioch, DB; Good, RA:
Depressed PHA-response in patients with non-lymphoid malagnancies, in Harris, J (ed): Proceedings of the 5th leucocyte culture conference, 339 - 358
Academic press, London

36. Gery, I; Davies, AM:
Organ specifity of the heart. I. Animal immunization with heterologous heart
J. Immunol. 87, 351 - 356, 1961

37. Gery, I; Davies, AM:
Organ specifity of the heart. II. Immunization of rabbits with homologous heart
J. Immunol 87, 357 - 361, 1961

38. Ghose, T; Mammen, M:
Interaction in vitro between myocardial cells and autologous lymphocytes and sera from patients with rheumatic carditis
Chest 71, 730 - 734, 1977

39. Gibofsky, A; Jaffe, EA, Fatino, M; Becker, CG:
The identification of HL-A antigens on fresh and cultured human endothelial cells
J. Immunol. 115 (3), 730 - 733, 1975

40. Goldrosen, MH; Gannon, PJ; Lutz, M; Holyoke, ED:
Isolation of human peripheral blood lymphocytes: Modification of a double discontinuous density gradient of Ficoll-Hypaque
J. Immunol. Methods 14, 15 - 17

41. Gröschel-Stewart, U:
Comparative studies of human smooth and striated muscle myosins
Biochim. Biophys. Acta 229, 322 - 334, 1971

42. Gupta, RK:
Immunological analysis of mouse heart antigens
Indian J. exp. Biol. 16, 680 - 682, 1978

43. Halbert, SP; Holm, SE; Thompson, A;
Cardiac auto-antibodies. I. Immunodiffusion analysis of multiple responses evoked homologously and heterologously
J. exp. Med. 127, 613 - 631, 1968

44. Halbert, SP:
The cardiac autoimmune system
Int. Arch. Allergy 41, 117 - 121, 1971

45. Halbert, SP; Lin, TM; Smith, S:
The cardiac autoimmune system. IV. Autoimmune myocarditis in rabbits immunized with rabbit heart
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 44, 783 - 796, 1973

46. Hasselbach, W; Kraemer, K:
Muskel. in Gauer, OH; Krämer, K; Jung, R (ed): Physiologie des Menschen, Band 4, 2. Auflage, München - Berlin - Wien. U & S-Verlag, 1975

47. Hawkins, BR; McDonald, M; Dawkins, RC:
Characterisation of immunofluorescent heterophil antibodies which may be confused with autoantibodies
J. clin. Path. 30, 299 - 307, 1977

48. Holm, SE; Halbert, SP; Lin, TM; Sobran, S; Woldow, N:
Cardiac auto-antibodies. II. Characterization, partial purification and attempted identification of the rabbit heart auto-antigens
Int. Arch. Allergy 38, 130 - 149, 1970

49. Horvàth, BZ; Gaetjens, E:
Antigenic constituents of chromatographed myosin
Biochim. Biophys. Acta 194, 310 - 319, 1969

50. Horvàth, BZ; Gaetjens, E:
Immunochemical studies on the light chains from skeletal muscle myosin
Biochim. Biophys. Acta 263, 779 - 793, 1971

51. Huber, SA; Job, LP; Woodruff, JF:
Lysis of infected myofibers by Coxsackievirus B-3-immune T lymphocytes
Am. J. Pathol. 98 (3), 681 - 694, 1980

52. Jntrop, HW:
Antigene des kardiovaskulären Systems und ihre immunpathologische Bedeutung
1. Auflage München - Wien - Baltimore: U & S-Verlag 1977

53. Jankovic, BD; Mitrovic, K; Popeskovic, L; Milosevic, D:
Passive transfer of experimental thyreoiditis, delayed hypersensitivity to thyreoglobulin and antithyreoglobin antibody formation in inbred Lewis rats
Clin. exp. Immunol. 5, 29 - 34, 1969

54. Kalikshtein, DB; Odinokova, VA; Peleev, NR, Gurevich, MA:
Hypersensitivity of delayed type manifested during the development of allergic lesions of the myocardium
Bull. exp. biol. Med. 77 (7), 789 - 791, 1975

55. Kaplan, MH:
Immunologic studies of heart tissue. I. Production in rabbits of antibodies reactive with an autologous myocardial antigen following immunization with heterologous heart tissue
J. Immunol. 80, 254 - 267, 1958

56. Kaplan, MH:
Immunologic studies of heart tissue. II. Differentiation of a myocardial sarcoplasmic antigen and cardiolipin
J. Immunol 80, 268 - 277, 1958

57. Kaplan, MN; Meyserian, M:
Immunologic studies of heart tissue. V. Antigens related to heart tissue revealed by cross-reaction of rabbit antisera to heterologous heart
J. Immunol. 88, 450 - 461, 1962

58. Kaplan, MN:
Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. I. Properties of an antigen in certain strains of group A streptococci exhibition an immunologic cross reaction with human heart tissue
J. Immunol 90, 595 - 606, 1963

59. Kaplan, MH; Craig, JM:
Immunologic studies of heart tissue. VI. Cardiac lesions in rabbits associated with autoantibodies to heart induced by immunization with heterologous heart
J. Immunol. 90, 725 - 733, 1963

60. Kaplan, MH:
The cross-reaction of group A streptococci with heart tissue and its relation to induced autoimmunity in rheumatic fever
Bull. Rheum. Dis. 19, 560 -. 567, 1969

61. Kaplan, MH; Frengby, JD:
Autoimmunity to the herat in cardiac diseases
Am. J. Cardiol. 24, 459 - 473, 1969

62. Katz, AM; Repke, DI; Rubin, BB:
Adenosinetriphosphatase activity of cardiac myosin. Comparison of the enzymatic activities and activation by actin of dog cardiac, rabbit cardiac, rabbit white skeletal and rabbit red skeletal muscle myosin
Circ. Res. 19, 611 - 621, 1966

63. Khaw, BA; Beller, GA; Haber, E; Smith, TW:
Localization of cardiac myosin-specific antibody in myocardial infarction
J. clin. Invest. 58, 439 - 446, 1976

64. Kiuchi, M; Takasugi, M:
The non-selective cytotoxic cell (n-cell)
J. nat. Cancer Inst. 56, 575 - 582, 1976

65. Kuch, J:
Autoantibodies directed against heart antigens and endocrine reactivity in patients with recent myocardial infarction
Cardiovasc. Res. 7, 649 - 654, 1973

66. Laufer, A; Rosenmann, E; Davies, AM:
Spontaneous and experimental myocarditis. The effect of Freund's adjuvant on the heart and other organs
Brit. J. exp. Pathol. 47, 605 - 611, 1966

67. Laufer, A; Davies, AM:
Experimental granulomatous myocarditis: Genesis and immunological aspects
Ann. N.Y. Acad. Sci. 156, 91 - 104, 1969

68. Laufer, A; Davies, AM; Gery, I; Friedman, I:
Experimental myocarditis: An autoimmune disease
Recent Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab. 1, 386 - 396, 1972

69. Laufer, A; Friedman, I; Ron, N:
In vitro and in vivo studies of the role of immune reactions in myocardial damage
Recent Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab. 2, 377 - 384, 1973

70. Laufer, A:
Human and experimental myocarditis. The possible role of immune processes in pathogenesis
Isreal J. Med. Sci 11, 37 - 67, 1975

71. McLaughlin, JF; Paterson, PhY; Hartz, RS; Embury, SH:
Rheumatic carditis: In vitro response of peripheral blood leucocytes to heart and streptococcal antigens
Arthritis Rheum. 15 (6), 600 - 608, 1972

72. MacLennan, ICM; Loewi, G; Harding, B:
The role of immunglobulins in lymphocyte-mediated cell damage in vitro. I. Comparison of the effects of target cell specific antibody and normal serum factors on cellular damage by immune and non-immune lymphocytes
Immunology 18, 397 - 404, 1970

73. MacLennan, ICM:
Antibodies in the induction and inhibition of lymphocyte cytotoxicity
Transplant. Rev. 13, 67 - 90, 1972

74. Lerner, RA; Dixon, FL:
Transfer of ovine experimental allergic glomerulonephritis with serum
J. exp. Med. 124, 431 - 443, 1966

75. Levine, S; Wenk, E; Hoening, EM:
Passive transfer of allergic encephalomyelitis between inbred rat strains. Correlation with transplantation antigens
Transplant. 5, 534 - 545, 1967

76. Levine, S; Wenk, E:
The production and passive transfer of allergic adrenalitis
Am. J. Pathol. 52, 41 - 49, 1968

77. Lin, TM; Halbert, SP; Cabal, L:
The cardiac autoimmune system. VIII. Heart specific autoantibodies produced in rabbits immunized with human heart
Immunological communications 1, 407-420, 1972

78. Lin, TM; Halbert, SP; Kiefer, D:
The cardiac autoimmune system. VI. Purification and further characterization of one of the human heart proteins which crossreact with rabbit anti-rabbit heart autoantibodies
Int. Arch. Allergy 43, 269 - 288, 1972

79. Lompré, A-M, Bouveret, P; Leger, J; Schwartz, K:
Detection of antibodies specific to sodium dodecylsulfate-treated proteins
J. Immunol. Methods 28, 143 - 148, 1979

80. Lowey, S; Steiner, LA:
An immunochemical approach to the structure of myosin and the thick filament
J. Mol. Biol. 65, 111 - 126, 1972

81. Maisch, B; Schuff-Werner, P; Berg, PA:
Immunphänomene nach Kardiotomie und Herzinfarkt
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 831 - 834, 1977

82. Maisch, B; Berg, PA; Kochsiek, K:
Immunologische Differenzierung der Perikarditis nach Myokardinfarkt
Intensivmedizin 16, 28 - 32, 1979

83. Maisch, B; Berg, PA; Kochsiek, K:
Clinical significance of immunopathological findings in patients with post-pericardiotomie syndrome. I. Relevance of antibody pattern
Clin. exp. Immunol 38, 189 - 197, 1979

84. Maisch, B; Schuff-Werner, P; Berg, PA; Kochsiek, K:
Clinical significance of immunopathological findings in patients with post-pericardiotomie syndrome II. The significance of serum inhibition and rosette inhibitory factors
Clin. exp. Immunol 38, 198 - 203, 1979

85. Maisch, B; Berg, PA; Kochsiek, K:
Autoantibodies and serum inhibition factors (SIF) in patients with myocarditis
Klin. Wochenschr. 58, 219 - 225, 1980

86. Maisch, B; Berg, PA; Kochsiek, K:
Immunological parameters in patients with congestive cardiomyopathy
Basic Res. Cardiol. 75, 221 - 222, 1980

87. Maisch, B; Trostel-Soeder, R; Berg, PA; Kochsiek, K:
Assessment of antibody mediated cytolysis of adult cardiocytes isolated by centrifugation in a continuous gradient of percoll™ in patients with acute myocarditis
J. immunol. Methods 44, 159 - 169, 1981

88. Maisch, B:
Herzmuskelantikörper bei Myokarditis
Med. Klin. 77, 114 - 118, 1982

89. Maisch, B; Trostel-Soeder, R; Stechemesser, E; Berg, PA; Kochsiek, K:
Immune reactions in patients with acute viral myocarditis
Clin. Exp. Immunol. 1982 (in press)

90. Masson-Pévet, M; Jagsma, HJ; Bruijne, deJ:
Collagenase and trypsin dissociated heart cells: A comparative ultrastructural study
J. Mol. Cell. Cardiol. 8, 747 - 757, 1976

91. Nakamura, RM; Weigle, PhD:
Transfer of autoimmune thyreoiditis by serum from thyreoidectomized donors
J. exp. Med. 130, 263 - 285, 1969

92. Newble, DI; Holmes, KT; Wangel, AG; Forbes, IJ:
Immune reactions in viral hepatitis
Clin. exp. Immunol. 20, 17 - 28, 1975

93. Opie, LH:
Metabolism of glucose U-C^{14} in perfused rat heart
Amer. J. Physiol. 203, 838 - 843, 1972

94. Oppenheim, JJ; Blaese, R; Waldmann, TA:
Defective lymphocyte transformation and delayed hypersensitivity in Wiskott-Aldrich's syndrome
J. Immunol. 104 (4), 835 - 844, 1970

95. Ouchterlony, Ö:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis
in P. Kallós (ed.): Progress in allergy 5, 1 - 78, Karger, Basel

96. Pearson, GR:
In vitro and in vivo investigations on antibody-dependent cellular cytotoxicity
Current Topics in Microbiology and Immunology 80, 65 - 96, 1978

97. Penhale, WJ; Farmer, A; MacCuish, AC; Irvine, WJ:
A rapid micro-method for the phytohaemagglutinin-induced human lymphocyte transformation test
Clin. exp. Immunol 18, 155 - 167, 1974

98. Perlmann, P; Perlmann, H; Wigzell, H:
Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro. Induction and inhibition by humoral antibody and of the effector cells
Transplant. Rev. 13, 91 - 114, 1972

99. Perlmann, P; Perlmann, H; Larsson, A; Wählin, B:
ADCC-effector lymphocytes (K-cells) in human blood
J. Reticuloendothel. Soc. 17, 241 - 253, 1975

100. Perry, SV:
in Milhovat, AT (ed.): Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders, 60 - 93
Exerpta Medic Foundation, New York, 1967

101. Portzehl, H:
Masse und Maße des L-Myosins
Zeitschr. Naturforsch. 5b, 75 - 78, 1950

102. Powell, T; Twist, VW:
A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and tolerance to calcium
Biochem. Biophys. Res. Comm. 72 (1), 327 - 333, 1976

103. Prager, EM; Wilson, AC:
The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes
J. Biol. Chem. 246, 5978 - 5989, 1971

104. Roitt, IM; Doniach, D:
WHO manual of autoimmune serology
WHO, Geneva, 1969

105. Roitt, I:
Leitfaden der Immunologie
autorisierte Übersetzung von P.A. Berg, 2. Auflage
Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1977

106. Schwartz, K; Sebag, C; Bouveret, P; Klotz, C; Swynghedaw, B:
Preparation of specific immune sera against rabbit skeletal, pig and human cardiac heavy meromyosin
Biomedicine 27, 22 - 27, 1977

107. Schwartz, K; Bouveret, P; Sebag, C; Leger, J; Swynghedaw, B:
Immunological evidence for the species specifity of mammalian cardiac myosin and heavy meromyosin
Biochim. Biophys. Acta 425, 24 - 36, 1977

108. Schwartz, K; Bouveret, P; Bercovici, J; Swynghedaw, B:
An immunochemical difference between myosin from normal and hypertrophied rat hearts
FEBS-Lett. 93 (1), 137 - 140, 1978

109. Schwarzfeld, TA; Jacobson, SL:
Development of adult myocardial cells in culture
J. Mol. Cell. Cardiol. 11 (suppl. 1), 56 - 68, 1979

110. Selgrade, MK; Ahmed, A; Sell, KW, Gershwin, EM; Steinberg, AD:
Effect of murin cytomegalyvirus on in vitro response of T- and B-cells to mitogens
J. Immunol 116 (5), 1459 - 1465, 1976

111. Sladkova, T; Stefan, J; Bicova, R:
Heart antibodies in the diagnosis of myocarditis
Cas. Lek. ces. (engl. Abstract) 118 (45), 1953

112. Smith, SB; Waksman, BH:
Passive transfer and labeling studies on the cell infiltrate in experimental allergic encephalomyelitis
J. Pathol. 99, 237 - 243, 1969

113. Starr, R; Offer, G:
Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations
FEBS-Lett. 15, 40 - 44, 1971

114. Theofilopoulos, AN:
Evaluation and clinical significance of immune complexes
Prog. Clin. Immunol. 4, 63 - 106, 1980

115. Thestrup-Petersen, K; Ladefaged, K; Andersen, P:
Lymphocyte transformation test with liver-specific protein and phytohaemagglutinin in patients with liver disease
Clin. exp. Immunol. 24, 1 - 8, 1976

116. Thompson, A; Halbert, PS:
The cardiac auto-immune system. III. Studies on the cytotoxicity of heart antibodies of pulsating rabbit and rat heart cells in tissue culture
Int. Arch. Allergy 40, 274 - 285, 1971

117. Thompson, A; Halbert, SP; Lin, TM; Kiefer, D:
The cardiac auto-immune system. IV. Rat anti-rat heart auto-antibody, and plasma protein allotypic differences between two colonies of Sprague-Dawley rats
Int. Arch. Allergy 41, 419 - 427, 1971

118. Tomioka, H:
The localization of anti-heart antibodies to heart tissue in rats and rabbits with special reference to the induction of granuloma of Aschoff body type
Acta Path. Jap. 20 (4), 451 - 466, 1970

119. Trisotto, A; Trisotto, M; Scaravilli, F; Ziliotto, D; Austoni, M:
Generalized myopathy induced by homologous heart homogenate and its transfer in guinea-pig
Kongressband Milan 1969: Muscel Disease
Satton, JN; Canal, N; Scarlato, G (eds.)
Exerpta Med. Amsterdam, 1970

120. Waldmann, TA; Durm, M; Broder, S; Blackmann, M; Blaese, RM; Strober, W:
Role of suppressor T-cells in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinaemia
Lancet I, 609 - 612, 1974

121. Weber, A:
The ultracentrifugal separation of L-myosin and actin in an actomyosin sol under the influence of ATP
Biochim. Biophys. Acta 19, 345 - 351, 1956

122. Wikman-Coffelt, J; Zelis, R; Fenner, C; Mason, DT:
Myosin chains of myocardial tissue. I. Purification and immunological properties of myosin heavy chain
Biochem. Biophys. Res. Comm. 51 (4), 1097 - 1104, 1973

123. Wikman-Coffelt, J; Zelis, R; Fenner, C; Mason, DT:
Comparative purification of myocardial myosin and antigenic specifity of the two light chains

124. Wong, CY; Woodruff, JJ; Woodruff, JF:
Generation of cytotoxic T lymphocytes during coxsackievirus B-3 infection. I. Model and viral specificity
J. Immunol 118 (4), 1159 - 1164, 1977

125. Wong, CY; Woodruff, JJ; Woodruff, JF:
Generation of cytotoxic T lymphocytes during coxsackievirus B-3 infection. II. Characterization of effector cells and demonstration of cytotoxicity against viral infected myofibers
J. Immunol. 118 (4), 1165 - 1169, 1977

126. Woodruff, JF; Woodruff, JJ:
Involvement of T lymphocytes in pathogenesis of coxsackie virus B-3 heart disease
J. Immunol. 113, 1726 - 1734, 1974

127. Woodruff, JF; Woodruff, JJ:
T lymphocyted interaction with viruses and virus infected tissues
Progr. med. Virol 19, 120 - 160, 1975

128. Woodruff, JF:
Viral myocarditis. A review
Am. J. Pathol. 101 (2), 426 - 484, 1980

129. Zabriskie, JB; Hsu, KC; Seegal, BC:
Heart reactive antibody associated with rheumatic fever: Characterisation and diagnostic significance
Clin. exp. Immunol. 7, 147 - 159, 1970

130. Zabriskie, JB:
Heart reactive antibodies: Do they cause rheumatic fever and the postpericardiotomy syndrome?
Med. Times 105, 11 - 19, 1977

131. Zoborovsky, AB; Davydor, AA; Arsenjew, SA; Bodarenko, AW:
Autoantikörper gegen die kontraktilen Proteine des Myokards bei Rheumatismus
Verh. Dtsch. Ges. Rheumatol. 5, 150 - 153, 1978

132. Zinkernagel, RM; Doherty, PC:
Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis with in a syngeneic or semiallogeneic system
Nature 248, 701 - 702, 1974

L E B E N S L A U F

Am 15. März 1954 wurde ich, Bernhard Wittner, als Sohn des Franz Wittner und der Gertrud Wittner in Hechingen geboren.

Von April 1961 bis April 1965 besuchte ich die katholische Volksschule, von April 1965 bis Juni 1973 das staatliche Gymnasium in Hechingen. Am 25. Juni 1973 legte ich die Reifeprüfung ab. Vom 1. Oktober 1973 bis 31. Januar 1975 leistete ich meinen Zivildienst.

Am 15. April 1975 nahm ich das Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen auf, das ich mit der ärztlichen Prüfung am 22.10.1981 abschloß.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation erfolgten an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung III (Direktor Prof. Dr. med. K. Kochsiek) in der Zeit zwischen April 1977 und Oktober 1980.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45